

---

## **Laktaasientsyymin steriilisuodatus**



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikan ko.

Visamäki, 8.11.2010

Teijo Pitkälä



Bio- ja elintarviketekniikka  
HÄMEENLINNA

Työn nimi                      Laktaasientsyymin steriilisuodatus

Tekijä                         Teijo Pitkälä

Ohjaava opettaja            Maritta Kymäläinen

Hyväksytty                  8.11.2010

Hyväksyjä                    Maritta Kymäläinen

## VISAMÄKI

Bio- ja elintarviketekniikka  
Meijeriteknologia

**Tekijä**

Teijo Pitkälä

**Vuosi** 2010**Työn nimi**

Laktaasientsyymien steriilisuodatus

## TIIVISTELMÄ

Työn tarkoitus oli selvittää ja parantaa laktaasientsyymien steriilisuodatusta Valio Oy Turengin tehtaalla. Tehdas valmistaa tuotteita, kuten ruoka- ja vispikermoja. Näistä tuotteista laktoosi pilkotaan entsyymaattisesti laktaasin avulla, jolloin tuotteista saadaan laktoosittomia tai vähälaktoosisia. Valmistetut tuotteet ovat ns. UHT- tuotteita. Laktaasientsyymi ei siedä lämpökäsittelyä, jonka vuoksi se steriloidaan suodattamalla. Steriilisuodatuksessa esiintyy runsaasti suodattimen tukkeutumista. Tilanne on pahentunut entsyymien laadullisen vaihtelun vuoksi. Suodattimia joudutaan vaihtamaan päivittäin, mikä aiheuttaa katkoksia prosessissa sekä kustannuksia.

Työssä selvitettiin entsyymiliuoksen suodatettavuutta ja pyrittiin löytämään keinoja suodattimen tukkeutumisen vähentämiseksi. Kirjallisuusosassa kerrotaan laktoosista, proteiineista ja näistä tarkemmin entsyymeistä. Lisäksi käsitellään kalvosuodatusta sekä suodatukseen liittyviä ongelmia.

Suodatuskokeet suoritettiin laboratoriotason suodatinlaitteistolla Valio Oy Turengin tehtaalla. Kokeet tehtiin käyttäen eri syöttöpaineita, virtausnopeuksia, lämpötilaa, pH:ta, suodatuksen apuaineita. Tulosten perusteella paras lämpötila-alue on jo käytössä prosessissa. Tässä testatulla apuaineella ei saavutettu suodattimen tukkeutumista estävää vaikutusta. Myöskään pH:n säätö ei auttanut.

Jatkotoimenpiteitä prosessiin olisivat entsyymilaimennoksen seisotuslämpötilan laskeminen 10 °C:een. Lisäksi, laimennos on hyvä valmistaa juuri ennen tuotannon aloittamista. Mikäli entsyymilaimennosten laatu ei parane, olisi hyvä lisätä suodatuspinta-alaa ja mahdollistaa suodattimen takaisin huuhtelun esim. uudenaikaisella suodatusmenetelmällä ja täten lisätä suodattimen käyttöikää.

**Avainsanat** Suodatus, Laktaasi, Hydrolyysi**Sivut** 41 s.

VISAMÄKI

Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering  
Dairy Technology

**Author** Teijo Pitkälä

**Year** 2010

**Subject of Bachelor's thesis**

Sterile Filtration of Lactase Enzyme

---

ABSTRACT

The aim of this thesis was to explore and improve the sterile filtration of lactase enzyme in Valio Oy Turenki plant. The main products in the factory are different kinds of creams such as food and whipping creams. Lactose is broken with lactase in order to get low lactose or lactose free products. Products which are manufactured are UHT- products. UHT means ultra high temperature treatment. Lactase enzyme doesn't tolerate heat treatment. This is the main reason why lactase is sterilized through filtration. There is a lot of clogging in the sterile filtration of lactase enzyme. The situation has worsened because of variations in the quality of the enzyme. Filters must be changed daily which causes lots of breaks and costs during the process.

Filterability of the lactase enzyme and methods to reduce clogging were explored. The literature part contains information about lactose, protein and enzyme in more detail. In addition to this, membrane techniques and problems concerning filtration area dealt with.

Filtration tests were run with laboratory equipment in Valio Oy Turenki plant using different feed pressures, flow rates, temperatures, pH and accessory agents in filtration. According to the results the best temperature is already used in the process. Accessory agent and adjustment of pH didn't improve the filtration rate and prevent clogging.

A further measure taken in the process was to lower the temperature of the enzyme dilution during water circulation to 10 °C. It could also be good to prepare the dilution just before starting production. If the quality of the lactase enzyme doesn't improve it could be advantageous to enlarge filter surface and enable back-flush with a new kind of filtration method. This could extend the lifetime of the filter.

**Keywords** Filtration, Lactase, Hydrolysis

**Pages** 41 s.

# SISÄLLYS

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | JOHDANTO .....  | 1  |
| 2     | PROTEIINIT .....  | 2  |
| 2.1   | Rakenne .....   | 2  |
| 2.1.1 | Aminohapposekvenssi .....                                   | 2  |
| 2.2   | Proteiinien liukoisuus ja siihen vaikuttavat tekijät .....  | 3  |
| 2.2.1 | pH:n vaikutus proteiinien varaukseen ja liukoisuuteen ..... | 3  |
| 2.2.2 | Molekyylien koko ja muoto .....                             | 3  |
| 3     | ENTSYYMIT .....   | 3  |
| 3.1   | Ominaisuuksia .....   | 4  |
| 3.1.1 | Katalyytti .....  | 4  |
| 3.2   | Lähtöaineiden valinta .....                                 | 4  |
| 4     | LAKTOOSI .....  | 5  |
| 4.1   | Rakenne .....   | 5  |
| 4.2   | Laktoosin entsymaattinen hydrolyysi .....                   | 6  |
| 4.2.1 | Laktoosin jälkihydrolyysi .....                             | 7  |
| 4.2.2 | Laktaasin eli $\beta$ -galaktosidaasin lähteet .....        | 7  |
| 4.3   | Laktoosi ravinnossa .....                                   | 8  |
| 5     | SUODATUS .....  | 9  |
| 5.1   | Normaalisuodatus eli ns. dead-end suodatus .....            | 9  |
| 5.2   | Kalvosuodatus .....   | 10 |
| 5.2.1 | Yleistä .....   | 10 |
| 5.2.2 | Steriilisuodatus .....                                      | 11 |
| 5.3   | Suodatuskalvot .....  | 11 |
| 5.3.1 | Kalvojen rakenne .....                                      | 12 |
| 5.3.2 | Jakeiden erotus .....                                       | 13 |
| 5.4   | Suodatin materiaalit .....                                  | 13 |
| 5.5   | Suodatinmoduulit .....                                      | 14 |
| 5.6   | Kalvosuodatuksessa esiintyviä ongelmia .....                | 14 |
| 5.6.1 | Konsentraatiopolarisaatio .....                             | 14 |
| 5.6.2 | Kalvon tukkeutuminen .....                                  | 15 |
| 5.7   | Olosuhteiden vaikutus suodatukseseen .....                  | 16 |
| 5.7.1 | Paine-ero kalvon yli .....                                  | 16 |
| 5.7.2 | Konsentraatio, pH ja ionivahvuus .....                      | 17 |
| 5.7.3 | Lämpötila .....   | 17 |
| 6     | PROSESSIOINGELMA JA SIIHEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT .....        | 17 |
| 6.1   | Ongelma .....   | 17 |
| 6.2   | Laitteisto: Tetra Aldose – Aseptinen annosteluyksikkö ..... | 18 |
| 6.3   | Tuotannossa käytettävä entsyymi .....                       | 18 |
| 6.3.1 | Toimintaperiaate .....                                      | 19 |
| 6.4   | Suodatinmoduuli .....                                       | 19 |
| 6.5   | Paine-ero kalvon yli tuotannossa .....                      | 19 |
| 6.6   | Entsyymilaimennosten pH .....                               | 20 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 6.7   | Laktaasientsyymin laimennoksen lämpötila..... | 21 |
| 6.8   | Lisäaineen valmistaminen .....                | 21 |
| 6.9   | Alkutilanne .....                             | 22 |
| 7     | SUODATUSKOKKEET.....                          | 24 |
| 7.1   | Ensimmäinen koesarja.....                     | 24 |
| 7.1.1 | Koelaitteisto ja –menetelmä .....             | 24 |
| 7.1.2 | Tulokset.....                                 | 26 |
| 7.2   | Toinen koesarja.....                          | 30 |
| 7.2.1 | Koelaitteisto ja menetelmä .....              | 30 |
| 7.2.2 | Tulokset.....                                 | 32 |
| 8     | TULOSTENTARKASTELU .....                      | 38 |
| 9     | PARANNUSEHDOTUKSET PROSESSIIN.....            | 39 |

---

## 1 JOHDANTO

Valio Oy Turengin tehdas valmistaa UHT- tuotteita. UHT tulee sanoista Ultra high temperature, joka tarkoittaa suomeksi iskukuumennusta. Iskukuumennuksella tarkoitetaan sterilisaattorilla tapahtuvaa kuumennuskäsittelyä, jossa tuotteen lämpötila nostetaan n. 140 °C:een muutamaksi sekunniksi. Käsittelyllä saadaan tuhottua tuotteen laatuun haitallisesti vaikuttavat bakteerit ja niiden itiöt. Tuotteille saadaan näin pidempi myyntiaika.

UHT- tuotteista valtaosa on eritasoisesti hydrolysoituja tuotteita. Tällä hetkellä valtaosa on vähälaktoosisia (Hyla®), mutta laktoosittomien tuotteiden kysyntä ja hyvät myyntiluvut ovat kasvattaneet niiden osuutta.

Opinnäytetyön tarkoitus oli selvittää ja kehittää laktaasientsyymin steriilisuodatusta Valio Oy Turengin tehtaalle. Laktaasin kohonnut käyttömäärä ja sen huono laatu ovat aiheuttaneet ongelmaa prosessissa. Työllä pyrittiin hankkimaan tietoa steriilistä suodattamisesta sekä parannusehdotusta suodatusprosessiin.

## 2 PROTEIINIT

Proteiineja esiintyy kaikkialla biologisissa prosesseissa. Ne toimivat monenlaisissa elämälle välttämättömissä tehtävissä, jossa niiden moninaisuudet ja erikoisuudet on havaittavissa. Lisäksi ne katalysoivat reaktioita, jotka jäisivät luonnossa tapahtumatta ilman näitä katalysaattoreita. (Stryer, 1988, 15- 16.)

### 2.1 Rakenne

Proteiinit koostuvat aminohapoista. Aminohappo taas koostuu amino-, karboksyyli-ryhmästä, vetyatomista ja tietyistä sivu -ryhmästä, joka on sidoksissa hiiliatomiin. Sivuryhmästä käytetään yleisesti R-ryhmä nimitystä, jolla siis tarkoitetaan yleisesti hiilivetyketjua.

Aminohappoon muodostuu näiden neljän erilaisen substituentin ansiosta kiraliakeskus, joka aiheuttaa optista aktiivisuutta. Näistä peilikuvista käytetään nimityksiä l- sekä d-isomeeri. Ainoastaan l- muotoa olevat isomeerit ovat proteiineissa ainesosina.

Sivuhaaroja voi olla 20 erilaista, jotka vaikuttavat aminohapon ja sitä kautta lopulta proteiinin ominaisuuksiin. Ne eroavat toisistaan koon, muodon, varauksen ja kemiallisen aktiivisuutensa perusteella. Kaikki proteiinit koostuvat 20 aminohaposta. Proteiinien laajavalikoima syntyy näistä 20 aminohapon muodostamista ketjuista, jotka saavat erilaisilla rakenteilla aikaan erilaisia ominaisuuksia.

Aminohapot liittyvät toisiinsa peptidi sidoksilla, joiden avulla ne voivat muodostaa polypeptidiketjuja. Ketjut ovat luonnossa yleisesti 50 – 2000 aminohappoja pitkiä. Jotkut proteiinit sisältävät disulfidi- sidoksia. Nämä ristisidokset ketjujen tai osien välillä muodostuvat kysteiinin hapetuksen seurauksena. (Stryer, 1988, 16- 29)

#### 2.1.1 Aminohapposekvenssi

Jokaisella proteiinilla on oma ainutlaatuinen aminohapposekvenssi, jonka määräävät geenit. Proteiinien sekvenssi alkoi selvitä vuonna 1953, kun Frederick Sanger määrittä insuliinin aminohapposekvenssin. Tämän jälkeen havaittiin sekvenssin tulevan geneista. DNA:n sisältämän nukleotidien sekvenssi, geenin perimätieto, muodostaa lähetti- RNA:n, joka määrää proteiinien aminohappoketjun rakenteen. Aminohapot muodostuvat tarkemmin vielä ns. ”kolmikosta”, jossa on kolme nukleotidiä ja nämä edelleen muodostavat ketjuna aminohapon koodin. Kolmikkoja voi olla yksi tai useampia. Aminohapposekvenssin ymmärtäminen auttaa käsittämään, miten proteiini käyttäytyy. Lisäksi aminohapposekvenssi määrää kolmiulotteisen rakenteen kääntymistä konformaatioonsa. Aminohapposekvenssi on linkkinä geneettisen tiedon DNA:n sekä kolmiulotteisen rakenteen välillä, jotka lopulta määräävät proteiinin biologiset ominaisuudet. Sekvenssin avulla voidaan tutkia ja oppia ymmärtämään tauteja. Vaihtelu



sekvenssissä voi aiheuttaa epänormaalia toimintaa ja tauteja. Sekvenssi valottaa proteiinien evoluutio historiaa. Proteiinien modifiointi ja lohkoaminen tarjoaa uusia keinoja kehittää niitä. (Stryer, 1988, 16- 29)

## 2.2 Proteiinien liukoisuus ja siihen vaikuttavat tekijät

Liukoisuus määrittyy proteiinin sisäisistä sekä proteiinin ja liuoksen välisistä voimista. Liukoisuus vaihtelee eri proteiinien välillä, mikä johtuu proteiinien koosta, muodosta, konsentraatiosta, varauksesta, poolisuudesta sekä poolittomuudesta. Amino- ryhmät, niiden järjestys ja proteiinien konformaatio vaikuttavat myös proteiinin liukoisuuteen. (Harrison, 1994, 129-135)

### 2.2.1 pH:n vaikutus proteiinien varaukseen ja liukoisuuteen

Neutraalissa pH:ssa (pH 7) liuoksessa aminohapot ovat pääasiassa dipolaarisia- ioneja enemmän kuin varauksettomia molekyylejä. Dipolisessa muodossa aminohapon amino- ryhmä on protolysoitunut ( $-\text{NH}_3^+$ ) ja karboksyyli- ryhmä dissosioitunut ( $-\text{COO}^-$ ). Ionisaatio taso aminohapoissa vaihtelee pH:n mukaan. Happamassa liuoksessa (pH 1), karboksyyli- ryhmä on varaukseton ja amino- ryhmä on ionisoitunut ( $-\text{NH}_3^+$ ). Emäksessä liuoksessa (pH 11), karboksyyli- ryhmä on ionisoitunut ( $-\text{COO}^-$ ), ja amino- ryhmä varaukseton ( $-\text{NH}_2$ ). (Stryer, 1988, 16- 29)

Varatut molekyylit ovat huomattavasti paremmin liukoisia veteen kuin niiden varauksettomat muodot, mikä johtuu varausten vaikutuksista vesi molekyyleihin. Vesi lisää vuorovaikutusta varauksillaan ja siten lisää liukoisuutta.

Varaus voidaan määrittää mm. pH:n mittauksella. Varausta voidaan muuttaa muuttamalla liuoksen ominaisuuksia, erityisesti pH:ta. Pienimmän liukoisuuden arvon proteiini saavuttaa isoelektrisessä pisteessä, missä proteiinin netto varaus on nolla. (Harrison, 1994, 129- 135)

### 2.2.2 Molekyylien koko ja muoto

Proteiinien muoto ja koko vaikuttaa oleellisesti sen liukenemiseen. Laimennoksen proteiinipitoisuus määrittyy proteiinin koosta, muodosta sekä kuvainnollisesta Stokesin säteestä. Stokesin säde on säde, joka määrittää teoreettisella tasolla molekyylin sädettä, eli kuvaa sen kokoa ja ominaisuuksia. Proteiinit, joilla on suuri Stokesin säde, ovat yleisesti huonoliukoisempia kuin kemiallisesti vastaavat proteiinit pienemmällä Stokesin säteellä. Eli mitä suurempi molekyylillä, sitä suurempi säde ja sitä vähemmän sisäisiä sitovia voimia. (Harrison, 1994, 129- 135)

## 3 ENTSYYMIT

Entsyymit määrittävät mallin biologisten systeemien toiminnalle katalysoimillaan reaktioilla. Ne myös välittävät niissä tapahtuvat muutokset eri-

tasoisille energioille, toisin sanoen laskevat aktivaatio energioita, jotta reaktiot tapahtuvat. Merkittävimmät ominaisuudet ovat entsyymien katalysointi voimat ja niiden erikoistuminen. Monien entsyymien toiminta on rajoitettua, koska niitä inhiboivat ja aktivoivat erilaiset aineet. Lähes kaikki tiedetyt entsyymit ovat rakenteeltaan proteiineja.

Makromolekyylit muodostuvat suurilta osin proteiinien ansioista ja näin niillä on merkittävä vaikutus niiden kemiallisissa reaktioissa. Siellä ne toimivat katalyytteinä sekä sidosaineina. Käyttämällä hyväksi kaikkia mahdollisia solunsisäisiä voimia, entsyymi tuo substraattit yhteen optimaalisissa olosuhteissa ja tämä toimii esivalmisteluna kemiallisten sidosten muodostamisessa sekä rikkomisessa. Ne katalysoivat reaktioita stabiloimalla siirtymäenergioita ja laskemalla aktivaatioenergian tarvetta, jolloin reaktio tapahtuu. Tällä valinnalla entsyymi määrittää mitä kemiallisia reaktioita lopulta tapahtuu. (Stryer, 1988, 177- 184)

### 3.1 Ominaisuuksia

Entsyymiä, joka katalysoi ensimmäisen vaiheen biosynteesissä väylässä, inhiboi lopullinen tuote. Tällaista inhibointia kutsutaan ”feed back inhibition”. Eli lopputuote inhiboi ensimmäistä vaihetta synteesissä. Inhibatiota välittää myös allosterinen vuorovaikutus, mikä tarkoittaa että joku inhiboiva efaktori liittyy proteiinin johonkin muuhun kohtaan kuin aktiiviseen kohtaan. Entsyymejä kontrolloi myös säätelijä proteiinit, jotka voivat joko inhiboida tai stimuloida. (Stryer, 1988, 177- 184)

#### 3.1.1 Katalyytti

Entsyymit kiihdyttävät reaktioita jopa miljoonakertaisiksi. Useimmat biologisten systeemien reaktioista jäisi tapahtumatta ilman entsyymien läsnäoloa.

Kun substraatti muodostuu lopputuotteeksi, sen on mentävä muutosvaiheen kautta, jossa vapaa energia taso on korkeammalla kuin tuotteella tai substraatilla. Entsyymien aktiivisuutta kontrolloi allosteerinen säätely, proteolyyttinen aktivaatio, inhibiittori proteiinit, stimulointi proteiinit ja käänteiset kovalenttiset modifikaatiot. (Stryer, 1988, 177- 184)

### 3.2 Lähtöaineiden valinta

Entsyymit ovat erittäin tarkkoja sekä katalysoidusta reaktiosta että lähtöaineiden eli substraattien, valinnassa. Entsyymi katalysoi yleensä vain yhtä kemiallista reaktiota tai reaktio joukkoa, jotka ovat samankaltaisia. Entsyymien katalysoimissa reaktioissa sivureaktiot harvoin johtavat tuotteen hyödyttömään muutokseen, toisin kuin katalysoimattomissa reaktioissa. Entsyymien vaatimus lähtöaineista on korkea ja joissakin tapauksissa entsyymille kelpaa vain ja ainoastaan tietty lähtöaine. (Stryer, 1988, 177- 184)

## 4 LAKTOOSI

Maitotuotteet ovat tärkeä ja hyvä lähde monelle kivennäis- ja hivenaineelle, kuten kalsiumille. Maito on myös hyvä proteiinin ja laktoosin lähde. On arvioitu että 70 %:lla maailman ihmistä on jonkin asteisia laktaasin puutetta elimistössä ja tämä aiheuttaa epämiellyttäviä ruuansulatuksellisia ongelmia. Laktoosia löytyy luonnossa lähes kaikkien nisäkkäiden maidosta (Taulukko 1) ja siten monet maitotuotteet sisältävät luonnostaan laktoosia (Taulukko 2). (Fox, 1997, 26, 39)

Taulukko 1 Joidenkin nisäkkäiden maidon laktoosi pitoisuuksia (Fox, 1997, 128)

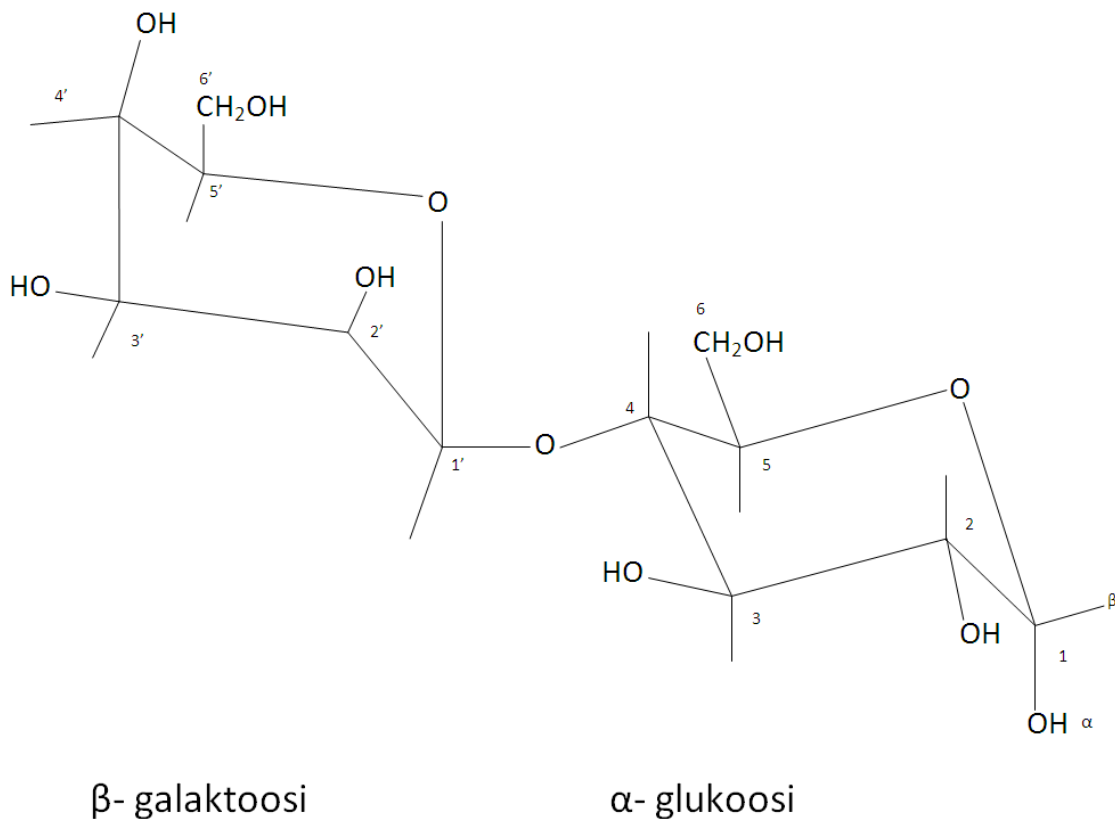
| Nisäkkäiden maitojen laktoosipitoisuuksia |                      |
|---|----------------------|
| Lähde:                                    | Laktoosi sisältö (%) |
| Ihminen                                   | 6,9- 7,5             |
| Lehmä                                     | 4,5- 5,0             |
| Aasi                                      | 6,0- 6,2             |
| Puhveli                                   | 3,7- 5,5             |
| Vuohi                                     | 4,1- 4,7             |
| Koira                                     | 3,1- 4,0             |
| Kissa                                     | 4,8- 4,9             |
| Jänis                                     | 2,0- 2,1             |
| Rotta                                     | 2,6- 2,8             |
| Poro                                      | 2,4- 2,6             |
| Meri leijona                              | 0                    |
| Hylje                                     | 2,6                  |
| Valas                                     | 1,8                  |

Taulukko 2 Joidenkin maitotuotteiden laktoosi pitoisuuksia (Fox, 1997, 128)

| Maitotuotteiden laktoosipitoisuuksia |                      |
|--------------------------------------|----------------------|
| Tuote                                | Laktoosi sisältö (%) |
| Täysmaito                            | 4,8                  |
| Rasvaton maito                       | 5,1                  |
| Kerma                                | 3                    |
| Jäätelö                              | 3,6                  |
| Maito suklaa                         | 8,1                  |
| Jogurtti                             | 4,0-4,6              |

### 4.1 Rakenne

Laktoosi muodostaa valtaosan maidon hiilihydraatista. Laktoosi, eli 4-O- $\beta$ -D-galaktopyranosylii-D-glukopyranoosi, tunnetaan paremmin maitosokerina. Laktoosi on siis disakkaridi, joka koostuu glukoosista ja galaktoosista (Kuva 1). (Fox, 1997, 1-2)



Kuva 1  $\alpha$ - laktoosin rakenne (Söderström, 2007, 2)

## 4.2 Laktoosin entsymaattinen hydrolyysi

Laktoosin pilkkominen voidaan tehdä entsymaattisesti laktaasilla. Laktaasi eli  $\beta$ -galaktosidaasi, on entsyymi, joka pilkkoo laktoosin galaktoosiksi ja glukoosiksi. Kaupalliset laktaasit valmistetaan hiiva kannoista tai sienistä. Hiivoilla tuotetulla entsyymillä pH optimi on 4-6. Glukoosi ja galaktoosi soveltuvat laktoosi-intoleransseille ja lisäksi ne imeytyvät elimistöön helpommin. (Fox, 1997, 24- 26)

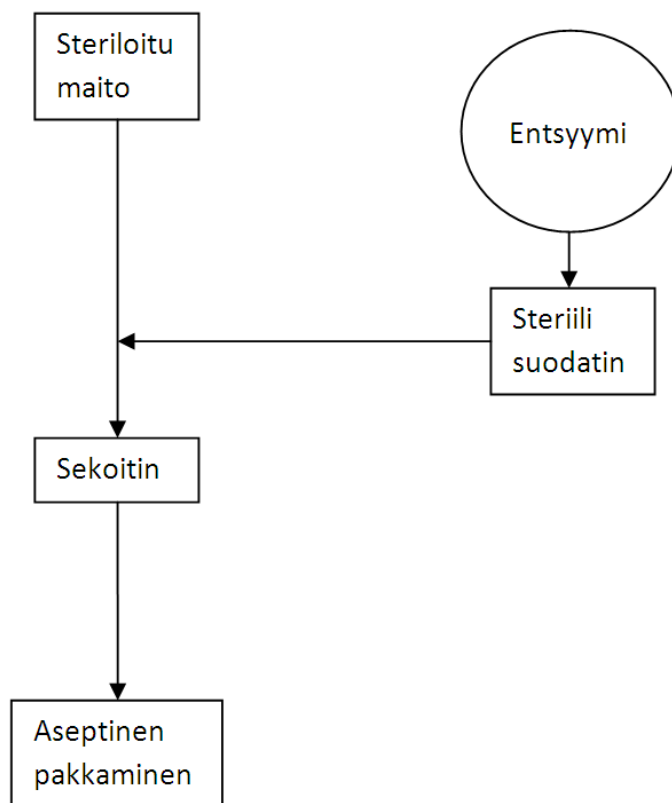
Laktoosin hydrolyysiä voidaan kuvata kolmessa vaiheessa tapahtuvana pilkkoitusreaktiona:

- Entsyymi + Laktoosi  $\rightarrow$  Entsyymi-laktoosi yhdiste
  - Entsyymi-laktoosi  $\rightarrow$  Galaktosyyli- Entsyymi + Glukoosi
  - Galaktosyyli- Entsyymi + H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  Galaktoosi + Entsyymi
  - Tai
  - Galaktosyyli- Entsyymi + vastaanottava sokeri  $\rightarrow$  Olikosakkaridi + Entsyymi
- (Tossavainen, 2008,15)

#### 4.2.1 Laktoosin jälkihydrolyysi

Laktoosittomien tuotteiden teollisessa valmistuksessa käytetään jälkihydrolyysiä laktoosin pilkkomisessa. Tässä prosessissa tarvitaan pieni määrä entsyymiä, jolla saadaan hajotettua laktoosi muutaman päivän aikana. Entsyymi on neutraalilla alueella toimivaa, hiivalla tuotettua laktaasia. Entsyymi suodatetaan steriiliksi ja lisätään maitoon, jonka jälkeen tuote pakataan aseptisesti (Kuva 2). Näin säästetään entsyymiä eikä tuotetta tarvitse seisottaa turhaan ja odottaa hydrolyysin tapahtumista. Näin tuotteelle saadaan pitkä myyntiaika.

Jälkihydrolyysi prosessi soveltuu UHT- tuotteille hyvin, koska tuote ei piilaannu korkeassakaan säilytyslämpötilassa ja korkea lämpötila edes auttaa laktoosin hajoamista lyhyessä ajassa. (Fox, 1997,95)



Kuva 2 Jälkihydrolyysin periaate (Fox, 1997,95)

#### 4.2.2 Laktaasin eli $\beta$ -galaktosidaasin lähteet

Taulukossa 3 on esitetty laktaasin tuottajaorganismeja, niiden kauppanimiä sekä toimittajia. Moni mikro-organisme tuottaa laktaasia, mutta vain harvat soveltuvat maitotuotteissa käytettävän laktaasin tuottajiksi. (Fox, 1997, 78)

Taulukko 3 Joidenkin kaupallisten laktaasin tuotanto mikrobit ja toimittajat (Fox, 1997, 39)

| Organismi                       | Kauppa nimi     | Toimittaja                      |
|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| <b>Bakteeri:</b>                |                 |                                 |
| <i>Bacillus spp.</i>            | Novozym 231     | Novo-Nordisk, Bagsvaerd, Tanska |
| <b>Hiiva:</b>                   |                 |                                 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>     | Maxilact        | Gist-Brocades, Delft, Hollanti  |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i>  | Lactozyme       | Novo-Nordisk, Bagsvaerd, Tanska |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | Hydrolact       | John Sturge, Selby, UK          |
|                                 | Neutral lactase | Pfizer, Milwaukee, USA          |
| <b>Home:</b>                    |                 |                                 |
| <i>Aspergillus niger</i>        | Lactose niger   | Ranidase Seelin, Ranska         |

Maito tuotteisiin käytetään laktaasia, jotka on tuotettu *K. fragilis* tai *K. laktis* -hiivalla. Niiden tuottama laktaasi soveltuu hyvin neutraalille pH alueelle ja sen takia niitä juuri käytetään maidoissa. Maito sisältää  $K^+$  ja  $Mg^{2+}$  -ioneja, jotka toimivat laktaasin aktivaattoreina. Kalsium-ioni toimii inhibiittorina laktaasille, mutta sen vaikutus laktaasiin on lähes merkityksetön.

Ainoa ongelma hiivaperäisessä entsyymissä on sen optimi hydrolyysin lämpötila, 30- 40 °C. Tässä lämpötilassa maito ja maitotuotteet pilaantuvat nopeasti. (Fox, 1997, 92)

#### 4.3 Laktoosi ravinnossa

Laktoosi on maidon suurin hiilihydraatin lähde. Se on 50- 52 % kaikesta maidon rasvattomasta kuiva-aineesta. Näin se muodostaa n. 30 % maidon kokonaisenergiasta.

Maito on luonnon monimuotoisimpia ravinnon lähteitä. Kuitenkin jopa 90 % maailman väestöstä kärsii ruuansulatuksellisista ongelmista nautittuaan laktoosia sisältäviä tuotteita. Vaivoja ovat mm. ilmavaivat, mahakivut, ripuli.

Jokaisella on syntyessään suolistossa runsas laktaasi- aktiivisuus, jonka ansioista lapsena voi käyttää maitoa ravintonaan. Maitosokeri pilkkoutuu glukoosiksi ja galaktoosiksi, jotka ovat huomattavasti helpommin käytettävissä olevia sokereita. Näin laktoosi saadaan hyödynnettyä energiaksi. Laktoosi onkin imeväisten suurin energian lähde.

Lapsi menettää kasvaessaan laktaasi- aktiivisuuden 3- 5 vuoden iässä, jolloin laktoosin pilkkominen ei enää onnistu elimistöltä. Laktaasi säilyy nykyisin elimistö alueilla, joissa maitoa on totuttu käyttämään ravinnon lähteenä. Joiltakin lapsilta puuttuu laktaasi jo syntyessään suolistosta.

Aikuisiän laktoosin herkkyyks taas johtuu laktoosin kertymisestä suoleen. Kun se saavuttaa riittävän suuren pitoisuuden, alkavat bakteerit käyttää si-

tä ravinnokseen. Tämä aiheuttaa laktoosin hajoamista maitohapoksi, rasvahapoiksi yms. jotka aiheuttavat ripulia ja löysän vatsan.

Laktoosin sietokyky on kehittynyt tuhansia vuosia sitten maidontuotannon seurauksena tietyissä maanosissa. Laktoosi- intoleranssi on periytyvä ominaisuus ja se on resessiivinen eli peittyvä ominaisuus. (Fox, 1997, 136-144)

## 5 SUODATUS

Suodatus määritellään perinteisesti kahden tai useamman komponentin erotukseen nesteestä perustuen pääosin hiukkasten kokoeroon. Siinä erotetaan komponentteja toisistaan koon mukaan ajamalla liuosta paineella huokoisen materiaalin läpi. Yleisesti sitä käytetään kiintoaineen erotukseen nesteestä tai kaasusta. Kalvosuodatus laajentaa tätä suodatuskäsitettä. Perinteiset suodatuskalvot, kuten kangas tai teräksinen verkko ei sovellu liuenneiden molekyylien tai elävien solujen erotukseen, vaan näihin on sovellettava kalvosuodatusmenetelmiä (Kuva 3). (Harrison, 1994, 57- 58; Cheryan, 1998, 1- 9)

| Erotukseen vaikuttava päätekijä | Käytettävät sovellukset eri erotusprosesseissa |        |                               |                             |                 |                     |                   |                    |  |                  |
|---------------------------------|--|--------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|--------------------|--|------------------|
| Koko                            | Ultrasuodatus                                  |        |                               | Mikrosuodatus               |                 |                     | Kuitu suodattimet |                    |  |                  |
| Diffuusio                       | Käänteis osmoosi                               |        |                               | Geeli kromatografia         |                 |                     |                   |                    |  |                  |
|                                 | Dialyysi                                       |        |                               |                             |                 |                     |                   |                    |  |                  |
|                                 | Nano suodatus                                  |        |                               |                             |                 |                     |                   |                    |  |                  |
| Ioni varaus                     | Elektrodialyysi                                |        |                               |                             |                 |                     |                   |                    |  |                  |
|                                 | Ionin vaihto                                   |        |                               |                             |                 |                     |                   |                    |  |                  |
|                                 |  |        |                               |                             |                 |                     |                   |                    |  |                  |
| Paine, lämpötila                | Tislaus/ Jäädytys konsentrointi                |        |                               |                             |                 |                     |                   |                    |  |                  |
| Liukoisuus                      | Liuotin uutto                                  |        |                               |                             |                 |                     |                   |                    |  |                  |
| Pinnan aktiivisuus              |  |        |                               | Vaahto ja kupla fraktiointi |                 |                     |                   |                    |  |                  |
| Tiheys                          | Ultrasentrifuugit                              |        |                               |                             |                 |                     |                   |                    |  |                  |
|                                 |  |        |                               | Sentrifuugit                |                 |                     |                   |                    |  |                  |
|                                 |  |        |                               |                             |                 |                     | Neste syklori     |                    |  |                  |
|                                 |  |        |                               | Gravitaatio sedimentaatio   |                 |                     |                   |                    |  |                  |
| Ångströr                        | 1  | 10     | 10 <sup>2</sup>               | 10 <sup>3</sup>             | 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>5</sup>     | 10 <sup>6</sup>   | 10 <sup>7</sup>    |  |                  |
| Mikronit                        | 1,E-04   | 1,E-03 | 1,E-02                        | 1,E-01                      | 1               | 10                  | 1,E+02            | 1,E+03             |  |                  |
|                                 | Ioni kokoluokka                                |        | Makromolekyyllisen kokoluokka |                             |                 | Mikroni partikkelit |                   | Hienot partikkelit |  | Karhea hiukkanen |

Kuva 3 Käytettävät sovellukset erotusprosesseissa jaoteltuna kokoluokittain (Ultrafiltration and Microfiltration handbook, Munir Cheryan, 1998, s.2)

### 5.1 Normaalisuodatus eli ns. dead-end suodatus

Normaalissa, perinteisessä suodatuksessa ajavana voimana on paine-ero kalvon yli. Paine-ero aikaansaadaan joko paineistamalla syöttöpuoli pumppun avulla tai tuottamalla alipaine tuotepuolelle. Normaalissa suodatuksessa suodatettava liuos ajetaan suodattimen läpi, permeatti eli suodos tulee läpi ja kiintoaine eli suodatinkakku jää kalvon pinnalle. Virtaus voi laskea hyvinkin nopeasti suodatin kakun muodostumisen vuoksi. Muodos-

tunut suodatin kaku voidaan poistaa käyttämällä mekaanista kakun poistoa tai takaisin huuhtelua. Tällä pyritään palauttamaan suodatus kapasiteetti. Suodatuksen tehoa voidaan parantaa myös muodostamalla vakuumi permeaatti puolelle. Tällaisissa tapauksissa suodatin kakkua poistetaan jatkuvasti mekaanisesti veitsellä. Joissakin tapauksissa käytetään apuainetta parantamaa suodatusta. (Nielsen, 2000, 15-17)

## 5.2 Kalvosuodatus

### 5.2.1 Yleistä

Kalvon päätehtävä on olla valikoivana muurina. Sen tulisi päästää läpi tietyt komponentit. Tällöin permeaatti koostuu vain halutuista komponenteista ja retentaattiin jää loput. Kalvot voidaan lajitella:

- kalvon luonteen mukaan
- kalvon rakenteen mukaan
- kalvon sovellusten mukaan

Kalvosuodatus termiä käytetään yleisesti ja siihen luetaan käänteisosmoosi, nanosuodatus, ultrasuodatus sekä mikrosuodatus. Kalvosuodatus prosessit on nimetty kuvaamaan erotus kykyä sekä niiden ominaisuuksia. Kalvotekniikat ovat erotusmenetelmiä, joissa erotus perustuu molekyylikokoon (mikro- ultrasuodatus) ja lisäksi erotuskykyyn on vaikuttamassa diffuusio ja ionivaraus (käänteisosmoosi ja nanosuodatus).

Kalvojen läpäisyominaisuuksia voidaan myös fysikaalisesti tai kemiallisesti muokata, esimerkiksi lisäämällä kalvoon varaus. Tästä huolimatta, kalvot voivat olla passiivisia tai reaktiivisia, riippuen kalvon kemiallisesta rakenteesta.

Synteettiset polymeerikalvot ovat mahdollistaneet uusia sovelluksia biologisten sivuvirtojen käsittelylle. Kalvosuodatus jaetaan kolmeen pääluokkaan, kalvojen nimellisen huokoskoon mukaan. Uutena on tullut nanosuodatus, joka luetaan myös näihin tekniikoihin. Nanosuodatusta on sanottu avoimeksi käänteisosmoosi suodatuksiksi, koska se päästää enemmän lävitseen. Mikrosuodattimien huokoskoko on 0,1 – 10  $\mu\text{m}$  ja niitä käytetään mm. solujen tai solujäänteiden erotukseen kasvatuslaimennoksisista. Ultrasuodatuskalvot, joissa huokoskoko on 0,001- 0,1  $\mu\text{m}$ , käytetään makromolekyylien, kuten proteiinien tai polysakkaridien, konsentrintiin. Nanosuodatus on huokoskooltaan ultrasuodatuksen ja käänteisosmoosin välissä eli 0,001- 0,0001  $\mu\text{m}$ . Sitä käytetään esim. meijeriteollisuudessa heran mineraalien erotuksessa. Käänteisosmoosissa huokoskoko kalvossa on alle 1 nm, jota käytetään liuenneitten mikroaineitten erotukseen, kuten epäorgaanisen suolan erotukseen vedestä. Raja MF- ja UF- menetelmien välillä on hälventynyt. Taulukossa 4 on listattu yleiset kalvoerotusmenetelmät:

Taulukko 4 Kalvosuodatustekniikoiden jaottelu



| Kalvosuodatustekniikoiden jaottelu |                            |                   |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------|
| Suodatus tyyppi                    | Käyttökohteet              | Huokoskoko        |
| Mikrosuodatus (MF)                 | Solut, solun pirstaleet    | 0,1 - 10 µm       |
| Ultrasuodatus (UF)                 | Proteiinit, polysakkaridit | 0,001 - 0,1 µm    |
| Nanosuodatus(NF)                   | Mineraalit                 | 0,001 – 0,0001 µm |
| Käänteisosmoosi (RO)               | Ionit, mikroliukoiset      | <1 nm             |

On suositeltu, että MF- menetelmää käytettäisiin liuksissa, jotka sisältävät partikkeleita kun taas UF- menetelmää käytettäisiin liuksissa, jotka sisältävät liuenneita makromolekyylejä. Usein hyvin pienten partikkeleiden, viruksien jne., suodatuksen käytetään UF suodatusta. Joskus niillä konsentroidaan soluja, erityisesti prosessihöyrystä, joka rikkoo MF suodattimen. Toisaalta MF suodattimen huokosia voidaan tutkia valomikroskoopilla, UF- suodattimista ei voida havaita huokoisia. (Harrison, 1994, 57- 58; Cheryan, 1998, 1- 9; Nielsen, 2000, 29)

### 5.2.2 Steriilisuodatus

Steriilisuodatus on sterilointimenetelmä, jolla herkäät aineet voidaan steriloida. Tällaisia ovat aineet, jotka eivät kestä lämpökäsittelyä. Steriilisuodattimen huokoskokoksi on määritelty 0,22 µm, vaikka steriiliyden määrittää bakteerien poistokyky. Valmistajat suosittelevat esisuodatusta, jotta steriiliys voidaan varmistaa. Steriilisuodatin tulee steriloida aina ennen tuotannon aloittamista ja tämä asettaa vaatimuksen suodatin materiaalille. Suodatuksen tulee olla täysin aseptista.

Steriilisuodatuksen tehokkuuteen vaikuttaa pääasiassa kalvon paksuus ja huokosten muoto. Suodatuksen tehokkuutta voidaan lisätä ohentamalla kalvoa tai pienennettävä huokoskoon vaihtelua. (Pall Corporation 2003; Steriloinnin yleiset periaatteet, 15.7.2010)

### 5.3 Suodatuskalvot

Kalvo on rakenne, joka erottaa kaksi tilaa toisistaan. Näiden välillä se kuljettaa lävitseen materiaa ja saa aikaan erotuksen fysikaalisilla sekä kemiallisilla ominaisuuksilla. Membraanit, eli suodatinkalvot, ovat yleensä ohuita huokoisia levyjä, yleensä alle 0,1 mm paksuisia.

Kalvon rakenne vaihtelee paksusta ohueen. Rakenne voi olla homogeeninen tai heterogeeninen. Siirto voi olla aktiivista tai passiivista; passiivisessa ajava voima voi olla paine, konsentraatio ero tai lämpötila. Kalvomateriaalit vaihtelevat synteettisestä luonnolliseen, synteettiset voivat olla orgaanisia tai epäorgaanisia. Kalvot voivat olla neutraaleja tai varauksellisia. Synteettiset kalvot voidaan jaotella lisäksi muotonsa tai rakenteensa mukaan symmetrisiin tai asymmetrisiin kalvoihin. Mikrohuukoiset ovat joko sylinterimäisiä huukoisia, huukoisia tai homogeenisia kalvoja. Nämä antavat kalvolle korkean validoinnin ja suuren läpäisykyvyn. Mikrohuukoiset materiaalit jaotellaan myös isotrooppisiin sekä anistrooppisiin. Isotrooppisessa huukosen koko on yhtenäinen koko kalvon paksuuden kun taas anistrooppisessa ne vaihtelevat pinnalta toiselle mentäessä. Mikrohuukoinen

---

kalvo on suunniteltu siten, että se pidättää kaikki partikkelit yli sen koon, eli jos kalvo on 0,22  $\mu\text{m}$  se läpäisee 0,22  $\mu\text{m}$  osittain ja kaiken sen alle.

Asymmetristen kalvojen läpäisykyky määrittyy sen pinnan ominaisuuksista. Näissä erotuskykyä kuvataan molekyylipainoina. Ne eivät tukkiudu niin kuin mikrohuokoiset kalvot, vaikka niilläkin on vuon alenemaa. Asymmetrisessä kalvossa on tiheä pinta ja sen alla huokoinen tukiranka. Näiden kalvojen paksuus vaihtelee 10- 200  $\mu\text{m}$ . Mitä ohuempi kalvo sitä suurempi vuo kalvon läpi. Tärkeintä on valita oikeanlainen ja sopiva suodatusmenetelmä ja materiaali kalvosuodattimeen.

Kalvoja voidaan luokitella valmistettavasta materiasta riippuen, esim. luonnolliset ja synteettiset kalvot; luonnolliset ovat biologisia ja ne voidaan jaotella vielä eläviin ja elottomiin kalvoihin. (Harrison, 1994, 58- 60; Nielsen, 2000, 39; Nielsen, 2000, 40- 41)

### 5.3.1 Kalvojen rakenne

MF ja UF kalvojen rakenteen välillä on joitakin eroja. Lähes kaikki UF kalvot ovat anisotrooppisia ja sisältävät ohuen pinnan, joka koostuu pienistä huokosista ja määrittää vuon kalvon läpi sekä läpäisevät hiukkaset. Sen alla on matriisi, joka sisältää suurempia huokosia kuin pinta. Sen tehtävänä on tukea rakennetta ja se määrittää pitoisuuksista johtuvan erotuksen. Kun molekyyli läpäisee pinnan, se kohtaa suhteellisen vähän vastustusta virratessaan läpi lopusta matriisista. Tämä rakenne minimoi kalvon sisäisten huokosten tukkiutumisen, joka on ongelmana isotrooppisissa kalvoissa.

Valtaosa MF kalvoista on isotrooppisia melko homogeenisella huokosrakenteella. Sisällä olevat huokokset ovat pinnan kokoluokkaa. Lähes kaikilla MF kalvoilla on epäsäännöllinen, vaihteleva ja yhtenäinen huokoinen rakenne, jossa huokoskooalla on tietty vaihteluväli. Tästä vaihtelusta johtuen, MF kalvot ovat alttiimpia paineesta johtuvalle rikkoutumiselle kuin UF kalvot. Joitakin asymmetrisiä MF kalvoja on jo kehitetty.

Valmistajat kertovat yleensä huokoskoon vaihteluvälin tai erottelu kyvyn kalvoilleen. MF kalvoille on määritelty nimellinen huokoskoko, joka varmennetaan jollakin fysikaalisella ominaisuuden mittauksella. UF kalvoille on määritelty nimellinen molekyylien cut-off arvo, joka kertoo molekyylipainoon perustuvan erotuskyvyn 90- 95 %:sti.

Liuenneitten aineiden tai partikkeleiden erotus MF ja UF kalvoissa on monimuotoinen ilmiö, joka riippuu huokosten koosta sekä muodosta, erotettavan aineen koosta sekä muodosta, sekä vuorovaikuttavien voimien läsnäolosta, kuten kalvon ja aineen välisestä varauksesta. Läpäisemätön materia voi muodostaa kalvon suodattimen pinnalle ja se voi estää pienienkin partikkelien läpäisyn. (Harrison, 1994, 58- 60; Proteiinien erotus ultrasuodatuksella, 3.8.2010)

### 5.3.2 Jakeiden erotus

Syväsuodatuksessa erotus tapahtuu syvällä suodattimessa. Erotus aiheutuu juuttumisesta tai adsorptiosta suodattimen matriisiin.

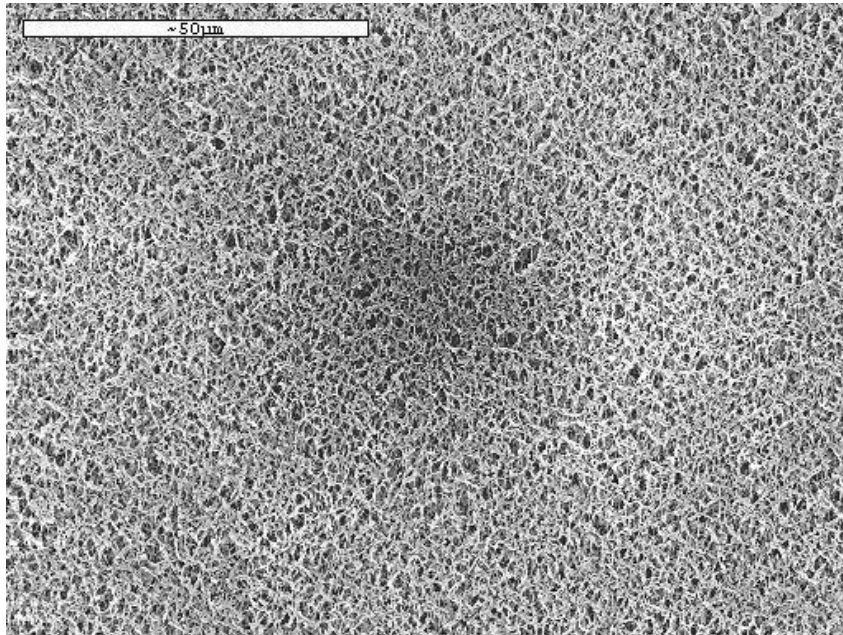
Pintasuodattimessa erotus tapahtuu kalvon pinnalla, kuten siivilässä. Rakenne on tiivis, tasainen ja jatkuva, huokoskoko on tarkkaan säädelty valmistuksessa. Etuna syväsuodattimiin verrattuna on, ettei siinä ole niin suurta vaaraa kalvon tukkeutumiseen tai läpi kasvuun. (Nielsen, 2000, 39-40)

### 5.4 Suodatin materiaalit

Polymeeriset kalvot on jaettu materiaalin mukaan kahteen pääluokkaan, selluloosasta sekä ei selluloosasta valmistettuihin. Selluloosakalvot sisältää regeneroituja selluloosaa ja selluloosan johdannaisia, kuten selluloosa nitraattia ja selluloosa asetaattia. Selluloosa sekä mono- ja diasetaatti johdannaiset ovat hydrofiilisiä, jotka auttavat minimoimaan proteiinien adsorptiota, joka puolestaan aiheuttaa kalvon tukkeutumista. Selluloosa kalvot eivät omaa vastustuskykyä kemikaaleja, mekaanista rasitusta ja lämpöshokkeja vastaan. Tämä estää niiden käytön useissa ison mittakaavan teollisissa sovelluksissa.

Ei sellulaariset kalvomateriaalit ovat tyypillisesti polysulfonia, polyamiinia, polykarbonaattia, polyakryylnitriittiä ja polypropyleeniä. Ne ovat sellulaarisia kalvoja kovempia ja vastustuskykyisempiä äärimäisiä pH arvoja, kemikaaleja sekä lämpöä vastaan. Ne ovat käytössä teollisten prosessien sovelluksissa, joissa höyrysterilointi sekä ajoittaiset kemialliset pesut ovat tarpeellisia. Nämä kalvot ovat yleensä hydrofobisia, joka voi aiheuttaa tukkeutumista proteiinien adsorptoituessa sekä denaturoituessa kalvon pinnalle. Kunnollisella pintakäsittelyllä on haluttu parantaa kalvon ominaisuuksia vastustamaan proteiinien adsorptiota.

Valtaosa kalvoista valmistetaan orgaanisesta materiaalista. Ne eroavat muovisista vain valmistustavassa, sillä ne valmistetaan märkänä. Nykyään kalvot kuivataan varastoinnin ajaksi, jotta vältetään rakenteen rikkoutumiselta. On olemassa satoja polymeerejä, mutta vain osa niistä soveltuu ominaisuuksiltaan suodatinmateriaaliksi. Näissä on otettava huomioon materiaalin rakenne, ominaisuudet sekä soveltuvuus. Käytettävät materiaalit eroavat toisistaan paljon. Orgaaniset on helppo valmistaa, mutta ne eivät kestä äärimmäisiä olosuhteita, kun taas epäorgaaniset kestävät paljon, mutta niitä on kallista valmistaa. Esim. polyvinyylidifluoridi PVDF, on hyvin inertti, kestää kemikaaleja ja voidaan lämpökäsitellä. Materiaalin pH:n sietovalue on laaja, välillä pH 1-11, 60 °C:ssa. Lisäksi se ei liukene orgaanisiin liuottimiin. Kuvassa 4 on nähtävillä käyttämättömän PVDF kalvon pinta kuvattuna valomikroskoopilla. (Harrison, 1994, 58- 60; Nielsen, 2000, 41- 44)



Kuva 4 Käyttämätön PVDF- kalvon pinta kuvattuna valomikroskoopilla (Colly Company kuvat)

## 5.5 Suodatinmoduulit

Erilaisia membraanimoduuleja on kehitetty erilaisiin teollisiin sovelluksiin. Kalvot on jaettu kahteen yleiseen rakenteeseen, putkimaiseen ja levyymäiseen. Putkimuoto on jaettu vielä kahteen luokkaan perustuen sisäiseen halkaisijaan. Ontot kuidut muodostavat pieniä membraanituubeja ja niiden sisäinen halkaisija on välillä 0,2- 2 mm. Ne on tehty samanlaisella pyöritys tekniikalla kuin synteettiset tekstiilit. Tubulaariset membraanit, joilla on suuri sisäinen säde, muodostuvat huokoisen sisälleen ja siten muodostavat sylinterin mallisen tukirakenteen.

Kalvojen tuki rakenne määrää mihin kaikkeen käyttöön se soveltuu. Kalvomateriaali ei muotoon taiteltuna ole riittävän tukevaa pysyäkseen koossa ilman apua. Nykyään kalvot asetetaan suoraan tukirakenteeseen, joka valmistetaan polystyreenistä tai polypropeenista.

Tukirakenteen materiaali on tärkeä osa, koska sen kestävyys määrittää suodattimen käyttöikä. Tukirakenteen koko ja muoto määrittää virtaus aukon koon, sekä lopullisen pinta-alan. (Harrison, 1994, 60; Nielsen, 2000, 47)

## 5.6 Kalvosuodatuksessa esiintyviä ongelmia

### 5.6.1 Konsentraatiopolarisaatio

Konsentraatiopolarisaatio johtuu kalvon eri puolille syntyvästä erisuuruudesta konsentraatiosta, tätä esiintyy sekä MF että UF kalvoilla. Konsentraatio on kalvon pinnalla huipussaan ja vähenee kalvon pinnalta sisäänpäin mentäessä. Tämä aiheuttaa voimia väkevyys erojen välille, sillä aineil-

la on luonnostaan pyrkimys tasoittaa väkevyyserot (osmoottinen paine). (Harrison, 1994, 62- 63)

### 5.6.2 Kalvon tukkeutuminen

Virtauksen väheneminen kalvon läpi liitetään usein kalvon tukkiutumiseen, jolloin huokoset tukkiutuvat yhdestä tai useammasta suodatettavasta materiasta.

On vaikeaa erottaa mistä virtauksen väheneminen milloinkin johtuu, sillä tukkeutuminen aiheuttaa myös konsentraatiopolarisaatiota. Tukkeutuminen eroaa konsentraatiopolarisaatiosta siten, että tukkeutunut kalvo aiheuttaa virtauksen heikkenemistä vakiopaineessa. Kalvon erotuskyky on vaikeaa palauttaa vaihtamalla suodatusolosuhteita. Yleensä tukkiutuneet kalvot pitää puhdistaa asianmukaisella tavalla, kuten pesuaineilla, entsyymeillä, äärimmäisillä pH:lla, tai hapettavilla aineilla, kuten hypokloriitilla tai vetyperoksidilla.

Tukkeutumiseen vaikuttaa pinnan kemialliset ominaisuudet ja kalvon fyysikaalinen morfologia. Proteiinien adsorptio on tunnistettu merkittävämäksi kalvojen tukkiutumisen syyksi. Kalvojen vuo voi muuttua merkittävästi, kun ne ovat proteiinia sisältävässä liuoksessa useita minuutteja. Yleisesti siis hydrofobiset kalvot kuten polysulfonista valmistetut, ovat alttiimpia proteiinien adsorptiolle. Tämä johtuu kalvon hydrofobisesta vuorovaikutuksesta ja hydrofobisesta vaikutuksesta. Ne eivät sido itseensä vettä, mikä aiheuttaa orgaanisen aineen tarttumista niiden pintaan ja tämä aiheuttaa kalvon kuivumista sekä tukkeutumista. Hydrofiiliset kalvot, kuten selluloosa, voivat olla vähemmän proteiineja adsorptioivia ja siten vastustuskykyisempiä tukkeutumiselle.

Epäsäännölliset huokosrakenteet, kuten useimmissa polymeerisissä MF kalvoissa, tekevät kalvoista helposti sisäisesti tukkeutuvia. Kohtalaisen isotrooppiset UF kalvot, tukkeutuvat myös nopeasti. Anistrooppiset UF kalvot omaavat hyvin pidättävän pinnan ja siksi eivät ole niin alttiita solujen juuttumiseen niiden sisäiseen rakenteeseen. Vaikka jotkut mikrohuokoiset MF kalvot on valmistettu keskinkertaisella anistrooppisuudella, silti MF kalvot ovat suhteellisen isotrooppisia rakenteeltaan ja kärsivät siten tukkeutumisesta. Kun käytetään mikrohuokoista MF kalvoa solulaimennoksen tai partikkeleiden suodattamiseen, ongelma usein ilmenee, kun kalvon solun osia pääsee kalvon sisälle huokosiin ja ne pysyvät siellä johtuen adsorptiosta tai fyysikaalisesta juuttumisesta ja vähentävät kalvon vuota. Takaisinhuhtelu on mahdollista, jos käytetään ontelokuittomallista suodatinta, ja sillä voidaan parantaa vuota, mutta ei ehkä voida täysin palauttaa sitä. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että UF kalvojen käyttö MF tarkoitukseen parantaa vuon vähenemistä ja antaa korkeamman suodatustehon kuin mikrohuokoiset MF kalvot, antaen ymmärtää että anistrooppiset UF kalvot pienemmällä pinnan huukoilla vastustavat tukkeutumista paremmin kuin MF kalvot.

Harrison (1994) mainitsee, että joissakin tutkimuksissa on havaittu tukkeutumisen aiheutuvan konsentraatiopolarisaatiosta. Proteiinilla voi olla

suurempi pyrkimys ryhmittäytyä konsentraatiopolarisaatio rajalle muodostamaan rykelmän kalvon pinnalle. Cross-flow suodattimilla on havaittu, että pieni virtausnopeus aiheuttaa suurempaa tukkeutumista kuin suurilla virtausnopeuksilla.

Vaahdonestoaineet voivat aiheuttaa ongelmia suodatusprosessissa solujen erotuksessa. Nämä materiaalit ovat hydrofobisia ja voivat helposti jopa alhaisina pitoisuuksina tukkia kalvon. Tästä syystä on suositeltavaa käyttää mekaanista vaahdonestoa prosesseissa, jotta vältetään kalvojen tukkeutumisilta.

Yhdessä laboratoriotutkimuksessa on havaittu että peristalttinen pumppu kehitti proteiinista ryppäitä, jotka lopulta tukkivat kalvon. Tutkimuksesta voidaan päätellä, että liialliset pumppaukset aiheuttavat vahinkoa suodattimille. (Harrison, 1994, 66- 68)

Tukkeutuneet kalvot voidaan yleensä puhdistaa pesuaineilla. Nämä voivat kuitenkin aiheuttaa kalvon eliniän lyhenemistä ja häiritä suodatusta. Ehdotuksia ongelmien poistamiseksi:

- Valitse hydrofiilinen, anistrooppinen kalvo välttääksesi proteiinien adsorptiota ja muita tukkeutumisia
- Käytä nopeaa virtausta minimoidaksesi konsentraatiopolarisaatio
- Jaksottainen takaisinhuuhdonta auttaa poistamaan tukkeutuneet partikkelit
- Säädä pH ja ionivahvuus oikein
- Vältä vaahdonestoaineita

(Harrison, 1994, 66- 68)

## 5.7 Olosuhteiden vaikutus suodatukseen

Suodatus olosuhteilla tavoitellaan maksimaalista tuottavuutta ja minimaalista konsentraatiopolarisaatiota sekä kalvon tukkeutumista. Suodatus, jossa erotellaan labiileja soluja sekä proteiineja, asettaa vaatimuksia lämpötilalle. Säädettäviä tekijöitä ovat yleensä paine-ero kalvon yli ja pH sekä ionivahvuus. (Harrison, 1994, 68)

### 5.7.1 Paine-ero kalvon yli

Yleensä on hyödyllistä pitää paine riittävän korkealla, jotta saadaan maksimi vuo kalvosta läpi. Liuoksen suodatukseen vaikuttaa paine-ero erityisesti silloin, kun höyryn erikokoisia komponentteja erotetaan suodattamalla.

Paineen nosto nostaa vuota tiettyyn pisteeseen, riippuen kalvon ominaisuuksista. Osmoottinen paine voitetaan paineen nostolla. Paineen nosto laskee liuenneitten aineiden läpäisyä, mutta se aiheuttaa pysyviä muutoksia kalvomateriaaliin. (Harrison, 1994, 68; Nielsen, 2000, 51; Proteiinien erotus ultrasuodatuksella, 3.8.2010)

### 5.7.2 Konsentraatio, pH ja ionivahvuus

Valtaosa tiedoista on yhdenmukaisia siinä, että vuo vähenee konsentraatioon kasvuun nähden. MF kalvoilla tilanne on monimutkaisempi, koska konsentraatio riippuu partikkeleiden diffuusioista.

Konsentroidintiprosesseissa, joissa tiettyjen partikkeleiden osuus kasvaa suodatuksen yhteydessä, vuon väheneminen on konsentraatiopolarisaatiosta johtuvaa ja voi aiheuttaa kalvon tukkeutumista. Joissakin tapauksissa konsentraatioiden suuret erot kalvon molemmin puolin voi aiheuttaa sen, että partikkelit tukkivat kalvon.

pH ja ionivahvuus vaikuttavat suodatusajoon erityisesti biologisilla komponenteilla. Solujen ja proteiinien pinnan varaus vaihtuu pH:n mukana. Isoelektrisessä pisteessä liuos voi saostua ja se voi aiheuttaa tukkeutumisen kasvua ja huonontaa kalvon suodatuskykyä. Korkea suola konsentraatio voi saostaa proteiinit, kun taas matala suolapitoisuus voi parantaa proteiinien liukoisuutta.

Materiaaleilla on tietty pH:n sieto, joka määrää mihin sitä voidaan käyttää. pH vaikuttaa makromolekyylien rakenteeseen sekä moneen muuhun liuoksen ainesosiin, jotka voivat aiheuttaa varauksia ja sitä kautta tukkeutumista. (Harrison, 1994, 70; Nielsen, 2000, 51; Proteiinien erotus ultrasuodatuksella, 3.8.2010)

### 5.7.3 Lämpötila

Lämpötilan nosto 10 °C laskee liuosten viskositeettiä tyypillisesti n. 2,5 %, joka kasvattaa kalvon läpäisy kapasiteettia. Viskositeetin lasku lämpötilaa nostamalla pudottaa paine-eroa ja helpottaa siten prosessia. Lämpötilan nosto voi aiheuttaa kemiallisia reaktioita kalvomateriaalin ja liuoksen välillä. Lämpötilan nostaminen mahdollistaa kalvomateriaalin liikkumisen. Lisäksi kovassa paineessa ja lämpötilassa materiaalin ominaisuudet voivat muuttua. Lämpötilan nosto parantaa pesuaineiden tehoa laskemalla pintajännitystä ja lisäämällä kemiallisten reaktioiden nopeutta. (Nielsen, 2000, 51)

## 6 PROSESSIONGELMA JA SIIHEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT

### 6.1 Ongelma

Valio Oy Turengin tehtaalla laktaasi tukkii suodattimen steriilisuodatuksessa. Suodatettavuus ei ole ollut tähän asti ongelma, koska suodattimen pinta-ala on ollut käyttömäärään nähden riittävä ja tuotanto määrät alhaisemmat. Viime syksynä ongelmat alkoivat lisääntyä laktaasin laatuvaihtelusta ja lisääntyneestä käyttömäärästä johtuen. Ongelma ilmenee pääsääntöisesti litran pakkauskoneelle ajavalla sterilisaattori Ilpolla. Tästä syystä seuranta kohdistettiin Ilpolle.

## 6.2 Laitteisto: Tetra Aldose – Aseptinen annosteluyksikkö

Tetra Aldose- aseptinen annostelulaitteisto (Kuva 5) soveltuu liuosten, joiden sisältämien ainesosien koko on pienempi kuin  $0,2\ \mu\text{m}$ , annosteluun. Tällaisia ovat mm. entsyymit, vitamiinit, aromit, suolasuspensiot yms., eli aineet, jotka eivät kestä lämpökäsittelyä. Sterilointi tapahtuu siis suodattamalla kalvolla, jonka huokoskoko on  $0,2\ \mu\text{m}$ . Annostelu voidaan säätää 5- 150 l/h, riippuen valitusta annostelu pumpusta. (Tetra Pak, 2010)



Kuva 5 Tetra Aldose laitteisto

## 6.3 Tuotannossa käytettävä entsyymi

Laktoosin pilkkominen tapahtuu prosessissa jälkihydrolyysinä, eli tuotteen lisätään entsyymi UHT- käsittelyn jälkeen ennen pakkaamista. Laktoosin hajoaminen tapahtuu pääosin pakkauksessa. Käytettävä entsyymi soveltuu hyvin maidon ja maitotuotteiden laktoosin pilkkomiseen, koska sen optimi pH alue on maidon pH alueella. Entsyymi on hiivaperäistä, *Kluyveromyces lactis* – kannasta valmistettua. Tällä kannalla valmistetun laktaasin lämpötilaoptimi on  $5\ ^\circ\text{C} - 30\ ^\circ\text{C}$ , pH optimi 6- 7. Laktaasiannostuksella ja lämpötilalla voidaan vaikuttaa hydrolyysin nopeuteen. Laktaasientsyymi säilyy tuotteessa aktiivisena, joten hydrolyysi aika voi olla pitkä.

([http://portal.hamk.fi/portal/page/portal/HAMI/Milkworks/Oppimateriaali/mita\\_maito\\_on/maidon\\_muut\\_ominaisuudet/happamuus](http://portal.hamk.fi/portal/page/portal/HAMI/Milkworks/Oppimateriaali/mita_maito_on/maidon_muut_ominaisuudet/happamuus), 12.7.2010)



Taulukko 5 Laktaasientsyymin esimerkki annostus, lämpötila ja vastaavasti tarvittava hydrolyysiaika (Entsyymivalmistajan esitysmateriaali 3/2003)

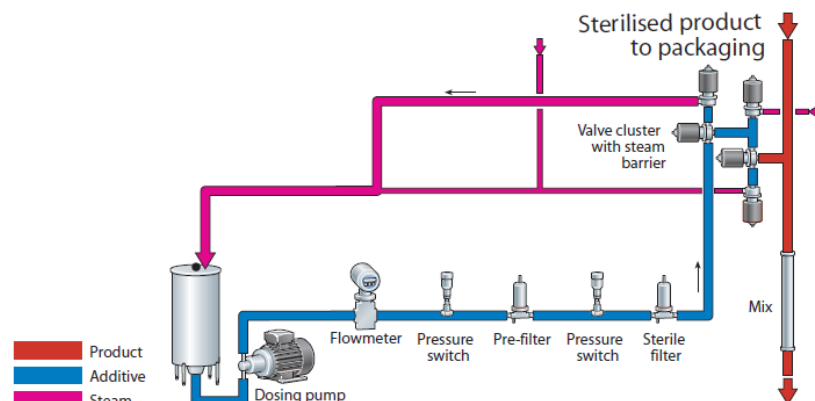
| Annostus<br>g/1000 kg | Lämpötila<br>°C (noin) | hydrolyysi aika<br>h |
|-----------------------|------------------------|----------------------|
| 300                   | 5                      | 24                   |
| 600                   | 5                      | 12                   |
| 200                   | 20                     | 4                    |

### 6.3.1 Toimintaperiaate

Entsyymistä valmistetaan laimennos annostelusäiliöön. Säiliöstä laimennos pumpataan suodattimille. Ensin liuos menee esisuodattimen läpi, jonka huokoskoko 0,2 µm ja sen jälkeen steriilisuodattimen läpi, jonka huokoskoko on myös 0,2 µm. Näin saadaan poistettua kaikki bakteerit ja itiöt. Pumppu on positiivinen siirtopumppu, jonka pumppaus tehoa voidaan säätää. Pumppu säätää tehoa virtausmittarin avulla. Aseptinen venttiili aloittaa annostelun ja lopettaa sen (Kuva 6).

Laitteisto steriloidaan höyryllä 121 °C 30 min ajan. Laitteisto pestään tuotannon päätteeksi CIP- pesuilla. (Tetra Pak, 2010)

Flowchart



Kuva 6 Laitteiston toimintaperiaate (Tetra Pak, 2010)

### 6.4 Suodatinmoduuli

Tuotannossa käytetään suodattimena PVDF materiaalista valmistettua kalvoa, jonka huokoskoko on 0,2 µm. Kalvo on patruunamoduulina suodatin pesässä. Sen pinta-ala vaihtelee tarpeen mukaan.

### 6.5 Paine-ero kalvon yli tuotannossa

Linjassa vallitsee aina ajossa tietty paine, joka osaltaan määrää paine-eron esi- sekä steriilinsuodattimen yli (Taulukko 6 ja 7).

Taulukko 6 Ilpon linjapaine, esisuodattimen paine sekä steriilinsuodattimen paine kahtena eri ajankohtana eri tuotteilla

| Ilpo<br>Prosessivaihe | Paine |      |
|-----------------------|-------|------|
|                       | bar   | bar  |
| Esisuodatin           | 1,6   | 0,78 |
| Steriilisuodatin      | 1,5   | 1,68 |
| Aseptisen säiliö      | 0,69  | 0,76 |

Taulukko 7 Soupranon linjapaine, esisuodattimen paine sekä steriilinsuodattimen paine kahtena eri ajankohtana eri tuotteilla

| Souprano<br>Prosessivaihe | Paine |      |
|---------------------------|-------|------|
|                           | bar   | bar  |
| Esisuodatin               | 2,39  | 2,41 |
| Steriilisuodatin          | 2,3   | 2,33 |
| Aseptinen säiliö          | 1,29  | 1,2  |

Linjassa tukkeutumista seurataan epäsuorasti esisuodattimen paineesta. Tämä paine ei itsessään suoraan kerro todellista tilannetta, mikäli tukkeutuminen on steriilissä suodattimessa tai jos paine linjassa on poikkeuksellisen korkea. Työssä haluttiin tutkia kalvon yli olevan paine-eron vaikutusta suodatettavuuteen sekä vuohon.

## 6.6 Entsyymilaimennosten pH

pH vaikuttaa proteiinin varaukseen merkittävästi mikä saattaa vaikuttaa proteiinin rakenteeseen. Mikäli proteiini on täysin varaukseton, eli isoelektrisessä pisteessä, se saostuu helpommin kuin muulloin. Pieni varaus pitää proteiinit erillään ja saa aikaan proteiinin rakenteen kokoon puristumista, joka auttaa suodatettavuuden parantamisessa. Työssä tutkittiin eri laimennosten pH:t (Taulukko 8 ja 9), jotta nähdään miten pH on suhteessa isoelektriseen pisteeseen. Jos pH on yli ie- pisteen, proteiinin varaus on positiivinen, jos alle, negatiivinen.

Taulukko 8 A.entsyymin vesiliuosten pH arvot

| a. entsyymi |                   |      |             |                 |              |                           |
|-------------|-------------------|------|-------------|-----------------|--------------|---------------------------|
| Laimennos   | Lämpötila<br>(°C) | pH   | Vesi<br>(g) | Entsyymi<br>(g) | Yht.<br>(g): | Entsyymipitoisuus<br>m- % |
| 70 %        | 18,7              | 7,22 | 60,27       | 140,09          | 200,36       | 69,92                     |
| 50 %        | 20,9              | 7,27 | 100,22      | 99,99           | 200,21       | 49,94                     |
| 30 %        | 22,5              | 7,35 | 140,19      | 59,81           | 200,00       | 29,91                     |
| 20 %        | 23,1              | 7,40 | 159,74      | 40,56           | 200,30       | 20,25                     |
| 10 %        | 24,0              | 7,48 | 181,68      | 20,34           | 202,02       | 10,07                     |
| 8 %         | 24,0              | 7,50 | 184,10      | 16,49           | 200,59       | 8,22                      |
| 5 %         | 23,9              | 7,54 | 189,91      | 11,32           | 201,23       | 5,63                      |
| 2 %         | 23,9              | 7,60 | 196,53      | 4,68            | 201,21       | 2,33                      |

Taulukko 9 b.entsyymien laimennoksen pH arvot

| b. entsyymi |                |      |          |              |           |                    |
|-------------|----------------|------|----------|--------------|-----------|--------------------|
| Laimennos   | Lämpötila (°C) | pH   | Vesi (g) | Entsyymi (g) | Yht. (g): | Todellinen laim. % |
| 70 %        | 18,30          | 7,56 | 61,02    | 139,90       | 200,92    | 69,63              |
| 50 %        | 20,70          | 7,60 | 100,57   | 100,05       | 200,62    | 49,87              |
| 20 %        | 23,00          | 7,71 | 159,54   | 40,40        | 199,94    | 20,21              |
| 5 %         | 23,50          | 7,80 | 190,64   | 10,06        | 200,70    | 5,01               |
| 2 %         | 23,70          | 7,84 | 195,99   | 4,25         | 200,24    | 2,12               |

Laimentamiseen käytetään vettä, joka on peräisin kunnan vesijohtoverkosta. Vesi suodatetaan ensin 4 µm esisuodattimella ja sitten 1 µm suodattimella. Veden pH on n.8.

#### 6.7 Laktaasientsyymien laimennoksen lämpötila

Entsyymilaimennos on Ilpolla 12,6 °C:ssa vesikiertojen aikana ja tuotannon ajossa 10 °C:ssa. Työssä tutkittiin myös lämpötilan vaikutusta suodatuvuuteen. Laktaasientsyymi säilytetään kylmässä jatkuvasti n.10 °C asteessa ennen laimennoksen valmistamista.

#### 6.8 Lisäaineen valmistaminen

Proteiinin liukoisuus laimennoksessa on merkittävä tekijä suodatuksessa. Mikäli proteiini ei ole oikeissa olosuhteissa, voi se aiheuttaa proteiinin saostumista, jotka voivat aiheuttaa kalvon tukkeutumisen. Tämä aiheuttaa erityisesti ongelmaa syväsuodattimissa, joiden suodatuskyvyn palauttaminen on vaikeaa.

Lisäaineen valmistamisessa oli ideana lisätä laimennos veteen proteiinien liukoisuutta mahdollisesti parantavia suoloja. Lisättävät suolat valittiin siten, että analysoitiin raakaa entsyymiä ja sen ionisisältöä. Tätä verrattiin laimennettuun liuokseen, jonka pohjalta valikoitui suolat sekä niiden lisäysmäärät.

Taulukko 10 Valio Oy T&amp;K suorittama ionien analyysi entsyymeistä

| 31.5.2010     |               |                 |               |                 |
|---------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
|               | a.entsyymi    |                 | b.entsyymi    |                 |
|               | Laimentamaton | Laimennettu 20% | Laimentamaton | Laimennettu 20% |
| Suola1. mg/kg | 830           | 180             | 46            | 23              |
| Suola2. mg/kg | 11000         | 2100            | 11000         | 3400            |

Suolat valittiin niiden pitoisuuksien perusteella, sekä miettimällä niistä aiheutuvia etuja/haittoja. Nämä kaksi koettiin tähän soveltuvaksi, koska ne

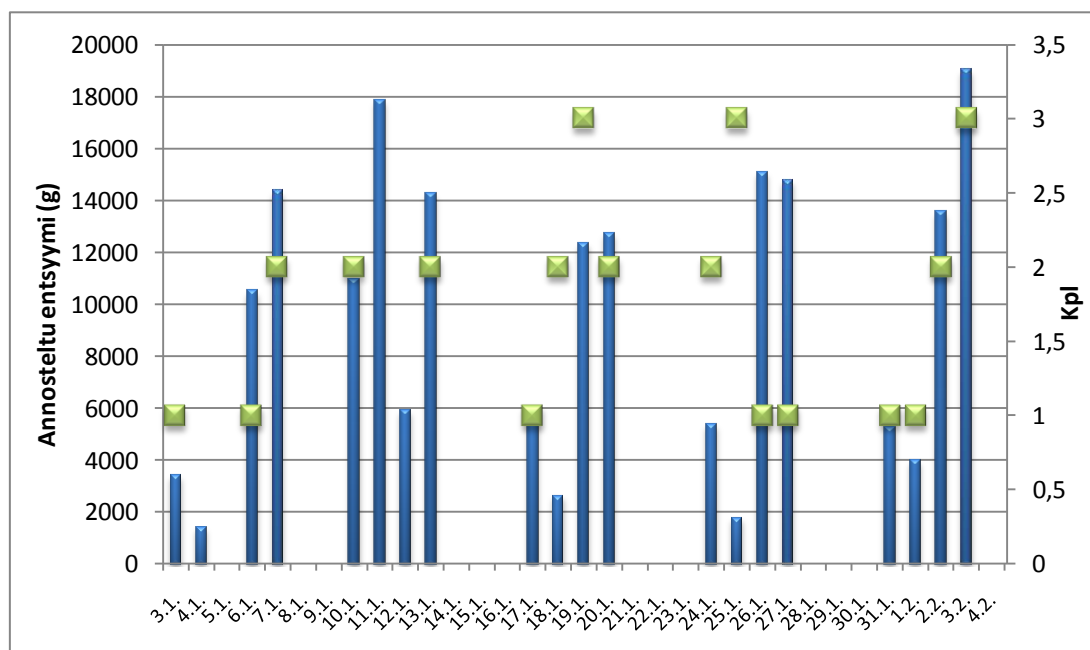
eivät aiheuta entsyymien aktiivisuuden alenemista tai muuta ongelmaa suodatuksessa. Laktaaseista määritettiin lisäksi laktaasiaktiivisuus

Taulukko 11 Valio Oy T&K suorittamaentsyymiaktiivisuus määrittäminen

| 18.5.2010         |                      | Proteiini (Lowry)<br>(%) | Laktaasi aktiivisuus<br>yks/g |
|-------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------------|
| <b>a.entsyymi</b> | Raaka                | 3,76                     | 7368                          |
|                   | Laimennettuna 20%    | 0,752                    | 1473,6                        |
|                   | suodatettu 20% laim. | 0,75                     | 1723                          |
| <b>b.entsyymi</b> | Raaka                | 5,11                     | 6997                          |
|                   | Laimennettuna 20%    | 1,022                    | 1399,4                        |
|                   | suodatettu 20% laim. | 1,52                     | 2196                          |

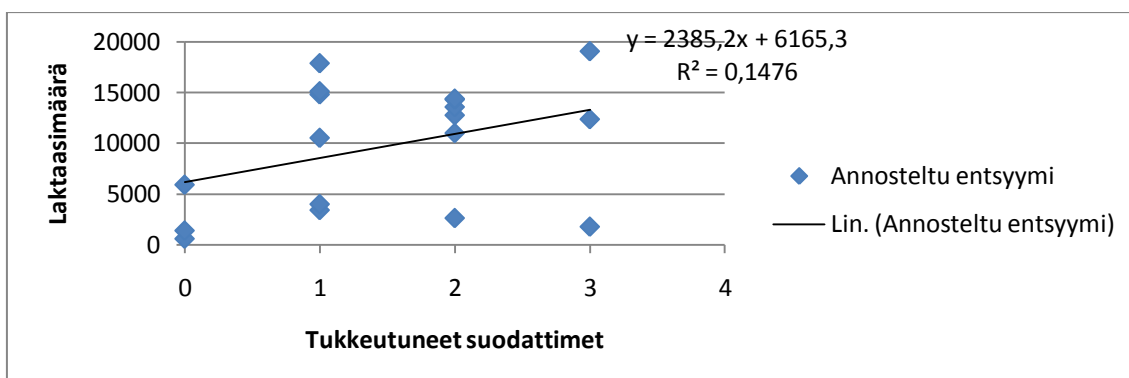
## 6.9 Alkutilanne

Tutkimuksen kannalta alkutilanne oli hyvä kartoittaa, jotta voidaan tulkitella mahdolliset eroavaisuudet tai muutokset prosessissa. Tämä tekee lisäksi työstä mielekkäämmän, koska tiedetään miten laaja ongelma on. Kaikilla sterilisaattoreilla käytetään samaa entsyymiä. Alkuelvitys tehtiin Ilpon sterilointiraportteista, koska ongelma ilmeni Ilpolla kaikkein selvemmin. Sterilointiraportti on asiakirja, jota Tuotemestari täyttää vuoronsa aikana. Siihen merkitään ajettava tuote ja sen tiedot. Sterilointiraportteista voidaan havaita milloin sterilisaattorilla on ajettu tuotetta ja koska se on ollut vesikierrillä. Tätä raporttia täytetään sitä mukaan kun ajo etenee. Kuvassa 5 on sterilointiraporttien pohjalta tehty kuvaaja, jossa nähdään päivittäin annosteltu laktaasi määrä sekä tukkeutuneet suodattimet.



Kuva 7 Tukkeutuneita suodattimia (kpl; neliömerkit ja/ käytetty entsyymimäärä, g; pylväät) päivässä aikavälillä 4.1- 4.2.2010

Tuotannossa oli tutkimus hetkellä tilanne, että n.1 kk:n aikana meni 31 kpl suodattimia tukkoon. Kuluneiden suodattimien määrä ei ole suoraan verrannollinen käytettyyn entsyymiin määrään (Kuva 5). Tämä todettiin tilastollisella tarkastelulla (Kuva 6)



Kuva 8 Annostellun entsyymiin ja tukkeutuneiden suodattimien hajontakuvio

Valittiin 5 % riskitasoksi yksisuuntaisessa testissä. Ensin tutkittiin korrelaatiokerroin kuvaajasta (Kuva 6). Korrelaatiokertoimen kriittiseksi arvoksi saatiin taulukosta  $n=18-1$ , arvo 0,412 joka on suurempi kuin tässä saatu 0,1476, mistä voidaan päätellä, ettei tukkeutuneiden suodattimien ja suodatetun entsyymilaimennoksen määrällä ole tilastollisesti merkittävää lineaarista riippuvuussuhdetta.

Sama voitiin havaita, kun suoritettiin korrelaatiokertoimen merkittävyys testi. Testissä muodostetaan korrelaatiokertoimesta sekä otoskoosta testisuure  $t$ , jolle katsotaan  $t$ -testin taulukosta kriittinen arvo.

$$t = \frac{R\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-R^2}}$$

Testisuureen kriittinen arvo katsotaan yksisuuntaisessa testissä  $n=18-2=16$  kohdasta. Kriittinen arvo on tällöin 0,412, joka on suurempi kuin testisuure 0,3842. Tämä siis osoittaa sen, että selvää syy seuraussuhdetta ei ole olemassa.

Korrelaatiokerroin ei ole täysin luotettava kertomaan syy-seuraussuhteesta, mutta kyseiset tulokset vahvistavat kuvaajasta nähtävää havaintoa.

Taulukko 12 Korrelaation kertoimien kriittiset arvot ja arvot

|                                       | 5% merk. |
|---------------------------------------|----------|
| Kriittinen arvo $t_{kr}$              | 1,746    |
| Pearsonin merkitsevyys testi arvo $t$ | 1,628    |
| Korrelaatiokerroin $R$                | 0,3842   |
| Korrelaation kriittinen arvo $R_{kr}$ | 0,412    |

## 7 SUODATUSKOKEET

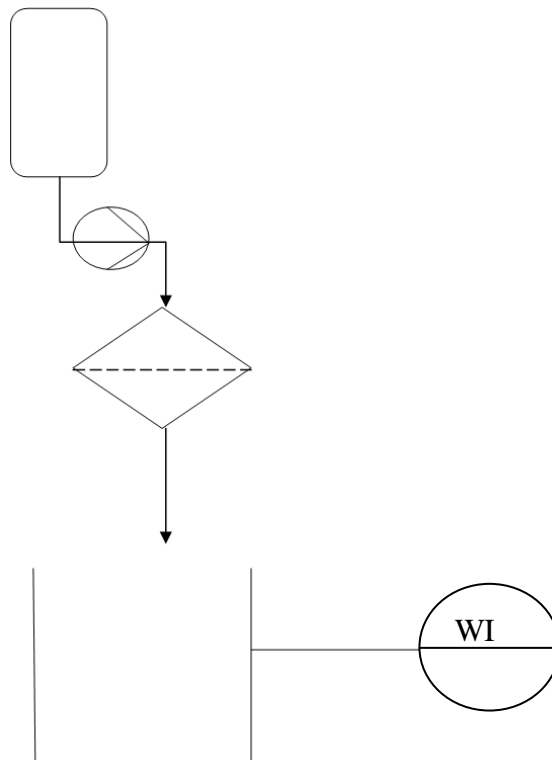
Suodatuskokeilla oli tarkoitus tutkia ja oppia havaitsemaan laktaasin laadulliset erot. Koetta hiottiin alussa mahdollisimman lähellä tuotannon käytäntöä. Aluksi käytettiin letkupumppua suodatuksessa (1.koesarja), mutta sen jälkeen vaihdettiin pumppu paineistettavaan syöttösuppilon (2.koesarja), koska haluttiin luoda vakio paineinen suodatus. Tämä helpottaa tulosten tarkastelemista ja tilastollista analyysiä, koska muuttuvia tekijöitä on vähemmän.

### 7.1 Ensimmäinen koesarja

Ensimmäisessä koesarjassa käytettiin entsyymiliuoksen syötössä suodatinelle letkupumppua.

#### 7.1.1 Koelaitteisto ja –menetelmä

Kuvassa 9 on esitetty laboratoriotason suodatuskokeissa aluksi käytetty koejärjestely, jossa syöttö tehtiin letkupumpulla. Suodatinyksikkö näkyy kuvassa 10. Kokeissa mitattiin lämpötilaa ja painetta (kuva 10). Syötettävää määrää seurattiin punnitsemalla syöttöastiaa (kuva 11).



Kuva 9 Suodatinlaitteisto letkupumpulla



Kuva 10 Suodatinpesä, lämpömittari ja painemittari



Kuva 11 Vaaka

Kokeita varten valmistettiin entsyymilaimennos, jonka pitoisuus oli 20 %. Laimennoksen pitoisuudeksi valittiin 20 %, koska se osoittautui kokeisiin soveltuvimmaksi. Valmistettavaksi määräksi valikoitui kokemuksen perusteella 2 litraa, koska määrä riitti hyvin päivän kokeisiin. Laimennoksen valmistamiseen käytettiin laktaasientsyymiä sekä samaa vettä, jota prosessissa käytetään. Vesi suodatetaan 4  $\mu\text{m}$  esisuodattimella sekä 1  $\mu\text{m}$  suodattimella. Laitteisto kootaan siten, että ensin kiinnitetään letkut toisiinsa. Letku laitetaan pumppuun kiinni, pumppu toimii siten, että se puristaa letkua kokoon ja vapauttaa sen jälkeen. Tämä synnyttää letkun etupuolelle ylipaineen ja alipaineen takapuolelle, joka saa aikaan virtauksen. Tästä letku jatkuu painemittarille, josta suodattimen kautta suodostastiaan. Ennen

suodattamisen aloittamista laitteisto huuhdeltiin vedellä. Huuhtelun jälkeen suodatinkalvo kastellaan kauttaaltaan. Sen jälkeen kalvo asetetaan suodatinpesään ja suodatinpesä ilmataan. Mittaus aloitettiin kun ensimmäinen tippa putosi suodosastiaan.

Suodatuskokeissa ei aluksi ollut jäähdytystä, myöhemmin otettiin käyttöön, jotta havaittiin lämpötilan vaikutus suodatettavuuteen. Letkupumpun vaihdosta syöttösuppilon päätettiin yhdessä työpaikalla, kun mittauksessa muuttuvien tekijöiden määrä haluttiin mahdollisimman pieneksi.

### 7.1.2 Tulokset

Letkupumpulla suoritettiin alussa muutamia minuutin kokeita, joilla tutkittiin vuota kalvon läpi. Tällöin valmistettiin a. entsyymistä 25 % laimennos, jota ajettiin letkupumpulla nopeudella 21 rpm. Minuutin ajon jälkeen paine kohosi mittarin kannalta maksimi arvoonsa ja ajo lopetettiin. Laimennosta meni läpi 150 g. Vaihrettiin uusi kalvo ja toistettiin koe. Entsyymiä meni läpi 100 g. Näiden kokeiden perusteella laskettiin vuo.

$$Vuo = \frac{150 \text{ g}}{17,34 \text{ cm}^2} / \text{min} \times 60 \text{ min/h} = 519 \frac{\text{g}}{\text{cm}^2 \text{h}}$$

Tuotannossa vuo on:

$$Vuo = \frac{7000 \text{ g}}{2100 \text{ cm}^2} / \text{h} = 3,33 \frac{\text{g}}{\text{cm}^2 \text{h}}$$

Jotta saataisiin sama vuo kokeeseen, laskettiin virtaus.

$$3,33 \frac{\text{g}}{\text{cm}^2} / \text{h} = \frac{x}{17,34 \text{ cm}^2 \text{ min}} \times 60 \text{ min} = > x = 57,8 \text{ g/h}$$

Kolmannessa suodatuskokeessa valmistettiin 25 % entsyymilaimennos a. entsyymistä. Laskettiin pumpun syöttönopeus arvoon 3 rpm ja tehtiin suodatuskoe. Suodatuskoe kesti 9 min.

Taulukko 13 16.3.2010 suoritettujen suodatuskokeiden tulokset

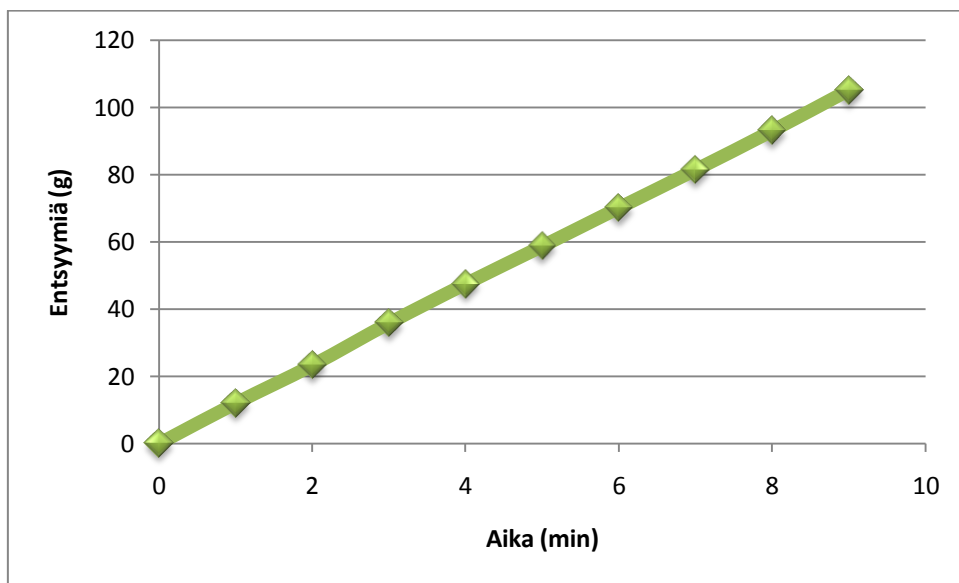
| Aika<br>(min) | Paine<br>(bar) | Laimennos<br>määrä (g) | $\Delta p$<br>(bar) | Entsyymi<br>määrä<br>(g) |
|---------------|----------------|------------------------|---------------------|--------------------------|
| 1             | 0,7            | 12                     | 0,2                 | 3                        |
| 2             | 0,75           | 23,3                   | 0,05                | 5,825                    |
| 3             | 0,75           | 35,8                   | 0                   | 8,95                     |
| 4             | 0,8            | 47,5                   | 0,05                | 11,875                   |
| 5             | 0,9            | 58,7                   | 0,1                 | 14,675                   |
| 6             | 1              | 70,1                   | 0,1                 | 17,525                   |
| 7             | 1,3            | 81,4                   | 0,3                 | 20,35                    |
| 8             | 1,7            | 93                     | 0,4                 | 23,25                    |
| 9             | 2              | 105,1                  | 0,3                 | 26,275                   |



Paine nousi 9 min kohdalla. Kun paine nousi yli 2 bar, koe lopetettiin. Tällöin laimennosta oli mennyt 105,1 g läpi. Vuoksi saadaan.

$$V_{uo} = \frac{105,1 \text{ g}}{17,34 \text{ cm}^2} / \text{min} \times 6,67 \text{ min} = 40,42 \text{ g/cm}^2/\text{h}$$

Paine nousi nopeasti ja suodatettu entsyymi määrä oli pieni. Kokeessa ei saavutettu tukkeutumista, vaan paineen nousu aiheutui selvästi laimennoksen suuresta viskositeetistä. Tästä syystä laimennoksen pitoisuutta haluttiin laskea, jotta kokeessa havaittaisiin tukkeutuminen. Tässä kokeessa ei ollut havaittavissa tukkeutumista, vaan paine kasvoi tasaisesti alusta asti (Taulukko 13) ja virtaus säilyi samana (Kuva 12). Tukkeutuminen nähdään virtauksen laskuna sekä paineen nousuna virtauksen pysyessä samana.



Kuva 12 16.3.2010 suoritettun suodatuskokeen entsyymi virtaus ajanfunktiona

Tässä vaiheessa alettiin laskea pinta-ala suhteen avulla, paljonko entsyymiä olisi mennyt läpi tuotannossa. Tuotannossa on siis käytössä samaa materiaalia oleva suodatin, jonka pinta-ala on 2100 cm<sup>2</sup> ja kokeessa käytettiin. Suhdetta laskettiin, koska haluttiin verrata miten hyvin kokeet vastaavat tuotannossa saatuja tuloksia.

Valmistettiin 10 % laimennos a. entsyymistä. Ajonopeudeksi säädettiin 2 rpm, koska 3 rpm antoi vielä liian suuren vuon verrattuna tuotantoon. 60 min kohdalla virtaus oli laskenut alas ja virtaus oli hiipunut, jolloin päätettiin lopettaa koe. Entsyymilaimennosta meni läpi 538 g, josta vuoksi saadaan:

$$V_{uo} = \frac{538 \text{ g}}{17,34 \text{ cm}^2} / \text{h} = 31,02 \text{ g/cm}^2/\text{h}$$

Vuo oli edelleen korkea verrattuna tuotantoon. Suodatuskokeen kesto kasvaisi n.10 h, jos vuo laskettaisiin tuotannon tasolle. Lisäksi letkupumpulla

ei ollut mahdollista laskea pumppaus nopeutta alle 2 rpm, joten päätettiin jatkaa tällä teholla.

Laskettiin seuraavasti:

$$\begin{aligned} \text{Tuotannossa menisi} &=> \frac{538 \text{ g} * 0,1}{17,34 \text{ cm}^2} = \frac{x}{2100 \text{ cm}^2} \rightarrow x \\ &= \frac{538 \text{ g} * 0,1}{17,34 \text{ cm}^2} * 2100 \text{ cm}^2 = 6515,57 \text{ g} \end{aligned}$$

Tästä saatiin, että tuotannossa olisi mennyt n. 6,5 kg entsyymiä läpi. Tätä koetta ei kuitenkaan voida suhteuttaa tuotantoon, koska suodatinta ei ajettu täysin tukkoon. Paine ei noussut yli 0,7 bar missään vaiheessa koetta ja virtaus säilyi samana.

Seuraavissa kokeissa käytettiin 20 % laimennosta, koska 25 % laimennos vaikutti liian viskoosilta ja paine nousi ilman tukkeutumista. 10 % laimennos vaikutti liian pieneltä, koska tällöin kokeen suoritus piteni huomattavasti ja merkkejä tukkeutumisesta ei ollut havaittavissa.

24.3.2010 suoritettiin koe, jossa käytettiin 20 % laimennosta. Laimennos valmistettiin a. entsyymistä. Kokeesta pyrittiin tekemään mahdollisimman toistettava. Mitattiin entsyymilaimennoksen lämpötila kokeen alussa ja lopussa. Alussa laimennos oli 24,3 °C ja jäähdyi 23,7 °C kokeen aikana.

39 min. suodatuksen jälkeen paine oli noussut yli 2 bar, jolloin oletettiin suodattimen tukkeutuneen ja koe lopetettiin. Suodatuskokeessa laimennosta meni läpi 337,9 g.

Suhteessa tuotantoon:

$$\begin{aligned} \text{Tuotannossa menisi} &=> \frac{337,9 \text{ g} * 0,2}{17,34 \text{ cm}^2} = \frac{x}{2100 \text{ cm}^2} \rightarrow x \\ &= \frac{337,9 \text{ g} * 0,2}{17,34 \text{ cm}^2} * 2100 \text{ cm}^2 = 8184,43 \text{ g} \end{aligned}$$

Vuo:

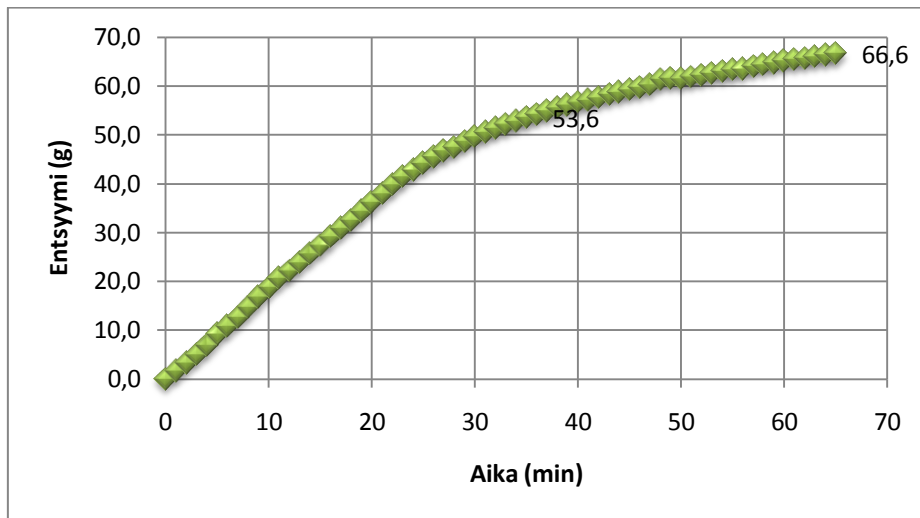
$$Vuo = \frac{337,9 \text{ g}}{17,34 \text{ cm}^2} / h * 1,53 h = 29,8 \text{ g/cm}^2/h$$

1.4.2010 Kokeeseen valmistettiin 20 % laimennoksen a. entsyymistä. Laimennosta valmistettiin 2 l/ koe tästä eteenpäin, koska tällä määrällä saatiin suoritettua riittävästi kokeita. Entsyymi on kallista ja tällä määrällä sitä ei mennyt haaskioon. Laimennokseen tuli 1600 g vettä ja 400 g entsyymiä. Laimennoksen pH on n. 7,4 edellisten mittausten perusteella. Mitauksessa meni läpi 272,5 g laimennosta läpi, eli tuotannon mittakaavassa:

$$\begin{aligned} \text{Tuotannossa menisi} &=> \frac{272,5 \text{ g}}{17,34 \text{ cm}^2} = \frac{x}{2100 \text{ cm}^2} \rightarrow x \\ &= \frac{272,5 \text{ g} * 0,1}{17,34 \text{ cm}^2} * 2100 \text{ cm}^2 = 6600,34 \text{ g} \end{aligned}$$

Suodatus kesti 32 minuuttia ja paine nousi ajon aikana tasaisesti yli 2 Bar:n. Painemittarissa on asteikko 2 Bar:in asti ja koe lopetettiin kun paine mittari nousi ”tappiin”.

11.5.2010 Suoritettiin suodatuskoe, joka vastasi 1.4 suoritettua. Valmistettiin 20 % entsyymilaimennos a. entsyymistä. Aloitettiin koe, mutta havaittiin 65 min jälkeen, ettei paine kasvanut enää. Päätettiin lopettaa koe. Laitteisto tutkittiin vuotojen varalta, mutta mitään vuotokohtaa ei ollut havaittavissa. Virtauksen vähetessä ja paineen noustua hieman yli 2 bar, kokeesta tuli vakiopainainen. Entsyymiä oli mennyt läpi n. 54 g tässä vaiheessa. Tuloksista (Kuva 13) voidaan havaita virtausnopeuden väheneminen tuolla kohdalla.



Kuva 13 11.5.2010 Suoritetun suodatuskokeen suodoksenmäärä ajan funktiona

Tästä virtauksen laskusta voidaan päätellä, että suodatin on tukkeutunut eikä laitteisto pysty kehittämään painetta nostaakseen virtausta. 65 min jälkeen oli suodattimesta mennyt läpi 332,9 g entsyymilaimennosta. Tuotantoon suhteessa:

$$\begin{aligned} \text{Tuotannossa menisi} &=> \frac{332,9 \text{ g}}{17,34 \text{ cm}^2} = \frac{x}{2100 \text{ cm}^2} \rightarrow x \\ &= \frac{332,9 * 0,2}{17,34 \text{ cm}^2} * 2100 \text{ cm}^2 = 8063,32 \text{ g} \end{aligned}$$

Verrattuna edelliseen vastaavaan suodatuskokeeseen havaittiin, että tällä kertaa saavutettiin suurempi läpäisy.

Suoritettiin toistokoe, kun entsyymilaimennos oli seisonut n. tunnin huoneen lämmössä. Tällä pyrittiin havaitsemaan, miten laimennoksen seisotus vaikuttaa kalvon tukkeutumiseen.

Koe suoritettiin samalla tavalla ja havaittiin sama kuin edellä. Paine ei kohonnut ”tappiin”, joten koe päätettiin keskeyttää 65 min kohdalla. Tällöin entsyymilaimennosta oli mennyt läpi 264 g. Toisto erosi edellisestä kokeesta siten, että virtaus alkoi laskea 25 min. kohdalla.

$$\begin{aligned} \text{Tuotannossa menisi} &=> \frac{264 \text{ g}}{17,34 \text{ cm}^2} = \frac{x}{2100 \text{ cm}^2} \rightarrow x \\ &= \frac{264 * 0,2}{17,34 \text{ cm}^2} * 2100 \text{ cm}^2 = 6349,46 \text{ g} \end{aligned}$$

Tämä toistokoe antaa viitteitä siitä, että sterilisaattorin vesikierron aikana tai tuotannon aloituksesta aiheutuva entsyymilaimennoksen seisominen laimennos astiassa aiheuttaa laimennokseen saostumaa. Kokeet toistivat samaa kaavaa, tulokset kuitenkin erosivat toisistaan. Lopussa mitattiin jälleen lämpötiloja ja päätettiin ottaa jäähdytys käyttöön jatkossa. Näin voidaan tutkia lämpötilan vaikutusta entsyymilaimennokseen.

Taulukko 14 Letkupumpulla suoritettujen kokeiden tuloksia 12 -31.5.2010

| Pvm.      | Kokeen kesto (min) | Laim. Läpi (g) | Ents. Läpi (g) | Tuotannossa (g) | Lämpötila (°C) | Entsyymi | Toisto |
|-----------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------|--------|
| 12.5.2010 | 65                 | 302            | 61,2           | 7401,6          | Ei mitattu     | b        |        |
| 17.5.2010 | 65                 | 430            | 86,0           | 10409,2         | Ei mitattu     | b        |        |
| 31.5.2010 | 65                 | 339,2          | 67,8           | 8211,2          | 12,0           | a        |        |
| 31.5.2010 | 65                 | 386,7          | 77,3           | 9361,0          | 11,7           | a        | x      |

Seuraavaksi selvitettiin lämpötilan vaikutusta suodattavuuteen. Suodatuslaitteistoon yhdistettiin jäähdytys ja suodatettavan liuoksen lämpötilaa seurattiin.

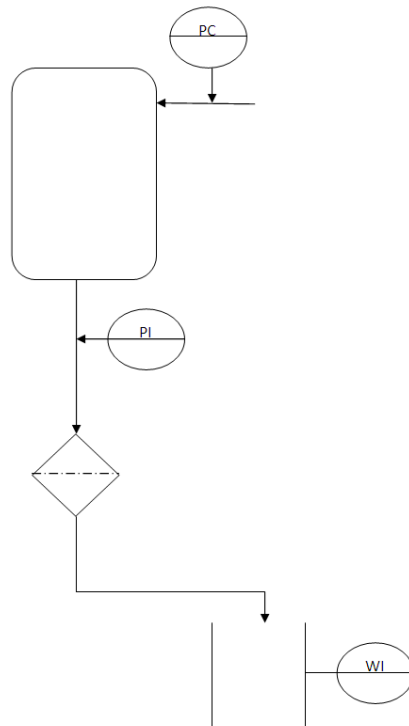
## 7.2 Toinen koesarja

Toisessa koesarjassa korvattiin 1. koesarjan letkupumppu syöttösuppilolla.

Ensimmäisen koesarjan tuloksista ja kokemuksistatodettiin, että koesysteemissä on liian paljon muuttuvia tekijöitä. Päätettiin kokeilla syöttösuppiloa, josta voitaisiin syöttää vakiopaineella entsyymilaimennosta. Syöttösuppiloon siirryttäessä hyväksyttiin, ettei koe enää virtausvuoltaan vastaisi tuotannon arvoja.

### 7.2.1 Koelaitteisto ja menetelmä

Syöttösuppilon rakenne ja toimintaperiaate eroavat paljon letkupumpusta. Letkupumpulla virtaus luodaan letkun tilavuutta pienentämällä ja syöttösuppilossa nostetaan paine paineilmalla, joka aiheuttaa virtausta vapaaseen suuntaan. Tästä syystä koejärjestely piti muuttaa syöttösuppilolle soveltuvaksi sekä hyväksyä sen aiheuttamat muutokset tarkastelussa.



Kuva 14 Paineistettava syöttösuppilo rakenne



Kuva 15 Paineistettava syöttösuppilo jäähdytys astiassa

Tässä vaiheessa toimittiin samalla tavalla, kuin letkupumpun kokeen kehittämisessä. Alussa tehtiin pienimuotoisia kokeita, joiden pohjalta koejärjestelyä hiottiin saatujen tulosten perusteella.

Syöttösuppilon tilavuus oli hieman yli 2 litraa, joten valmistetun entsyymilaimennoksen määrä pidettiin samana. Haittapuolena paineistettavassa laitteistossa oli se, että kun entsyymi kerran laitettiin suppiloon, ei laitteistoon voinut lisätä entsyymiä ylipaineen vuoksi. Syöttösuppilo oli suljettu,

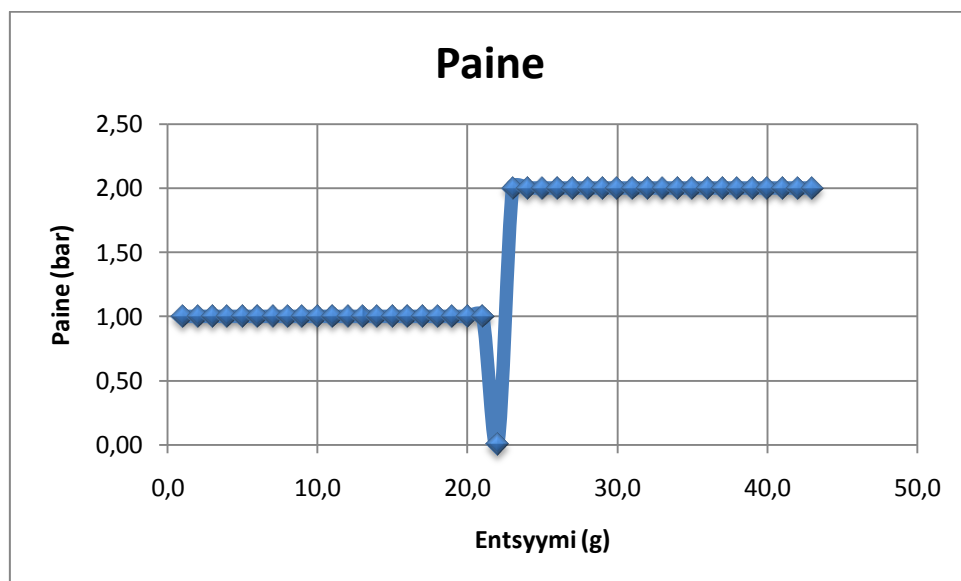
joten entsyymiä ei voitu jäähdyttää sisältäpäin. Jäähdytys ratkaistiin siten, että laitteisto upotettiin jääveteen. Laitteiston lämpötilaa seurattiin epäsuorasti jääveden lämpötilasta. Entsyymiä ei voitu sekoittaa syöttösuppilossa.

Ensimmäisessä kokeessa käytettiin a. entsyymiä, josta valmistettiin 2 litraa 20 % entsyymilaimennosta. Laimennos valmistettiin samaan veteen, jota prosessissa käytetään, eli se on suodatettu 4  $\mu\text{m}$ :n sekä 1  $\mu\text{m}$ :n suodattimen läpi. Laimennos sekoitettiin hyvin ja jäähdytettiin  $+8,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

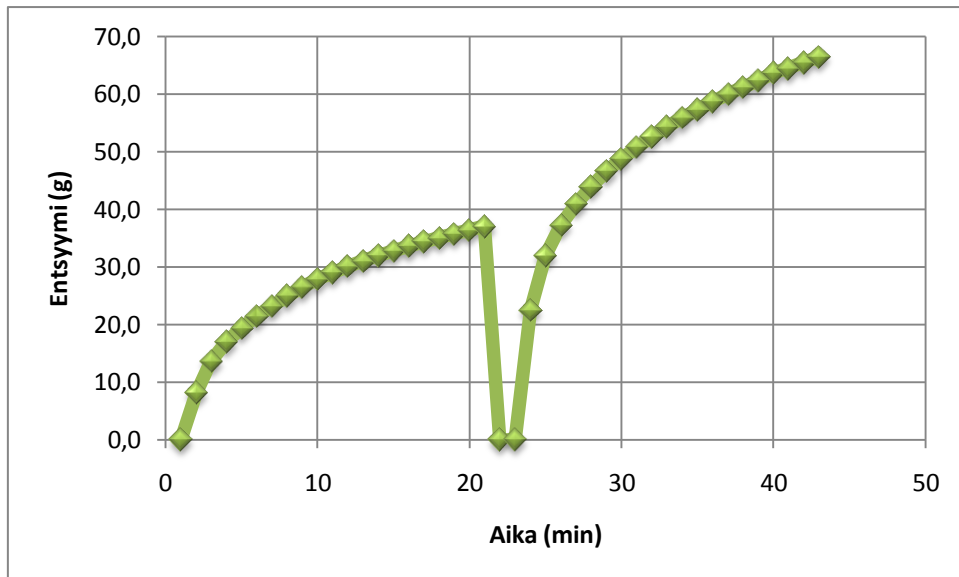
Ennen kokeen aloittamista syöttösuppilo täytettiin laimennoksella ja laskettiin jääveteen. Tämän jälkeen laimennos ajettiin suppilosta suodatin pesälle asti. Suodatin kasteltiin vedessä, jota käytettiin laimennoksen valmistamiseen. Kun suodatin oli täysin kastunut, se asetettiin suodatin pesään ja pesä suljettiin. Kun laitteisto oli kassassa, avattiin suodatinpesän ilmausruuvi ja laskettiin entsyymilaimennosta suppilosta niin kauan, että kaikki ilma oli poistunut laitteistosta. Tämän havaittiin siitä, että ilmausruuvista tuli vain nestettä. Sitten ilmausruuvi suljettiin ja vaaka nollattiin. Mittaus voitiin aloittaa.

### 7.2.2 Tulokset

Ajopaine valittiin testin perusteella, jossa ajettiin n. 20 minuuttia vakio-paineella ja katsottiin vuotoa. Koepaineiksi valittiin 1 bar ja 2 bar. Tulokset on esitetty kuvissa 16 ja 17.



Kuva 16 Ensimmäisten syöttösuppilo kokeiden paineen muutos entsyymien massavirtauksen funktiona

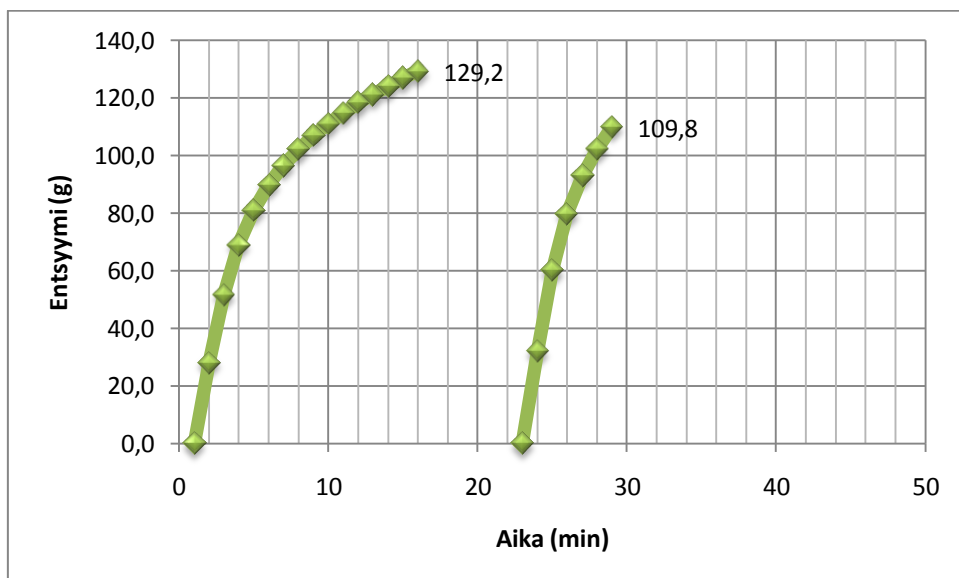


Kuva 17 Entsyymien muutos ajan funktiona

Näiden tulosten perusteella valittiin kokeeseen paineeksi 2 bar, koska paineella koe saatiin suoritettu nopeammin ja tässä paineessa kalvon tukkeutuminen oli suhteessa samankaltaista kuin 1 bar:ssa tukkeutuminen.

Seuraava koe suoritettiin b. entsyymillä, jotta nähtäisiin miten se käyttäytyy kokeessa. Koe tehtiin samalla tavalla ja entsyymien laimennos oli vastaava.

Edellisessä kokeessa laitteistossa ei ollut suljettavaa hanaa pysäyttämään laimennoksen virtausta, tämä vaikeutti kokeen suorittamista, koska ilmaus oli vaikeaa suorittaa. Tästä syystä syöttösuppilon jälkeen lisättiin hana, jolla virtaus voitiin tarvittaessa pysäyttää. Suoritettiin kaksi koetta, toinen kesti n. 15 min, toinen vajaa 10 min.



Kuva 18 Entsyymien muutos ajan funktiona

Merkittävin tulos kokeessa oli se, että b. entsyymiä suodattui samalla paineella huomattavasti enemmän kuin a. entsyymiä. Tämä oli tiedossa let-

kupumpulla suoritettujen kokeiden perusteella, mutta eron suuruus oli yllättävän iso.

Edellisen kokeen perusteella jäi epävarmuus siitä, oliko suodatin ehjä tai vuotiko laitteisto, joten koe uusittiin. Uusinta kokeessa tulos oli vastaavanlainen, b. entsyymiä meni jälleen 10 min. n.110 g. Koska b. entsyymiä suodattui kokeessa paljon, päätettiin keskittyä a. entsyymiin. A. entsyymissä mahdolliset muutoksen näkyisivät selvemmin ja b. entsyymiä ei voitaisi ajaa kuin yksi ajo kerrallaan, koska yhdestä suodattimesta menisi melkein 2 litraa laimennosta läpi.

Seuraavissa kokeissa käytettiin siis a. entsyymiä. Valmistin samalla tavalla entsyymi-vesilaimennoksen kuin ennenkin, jäähdytin laitteiston ja entsyymin n.8°C:een. Tarkoitus oli toistaa koetta mahdollisimman monta kertaa, jotta nähtäisiin miten kokeet onnistuvat. Aloitettiin suodatus ja ensimmäinen suodatin tukkeutui n. 30 min kohdalla. Tällöin virtaus oli hiipunut olemattomiin eikä muutamassa minuutissa tullut kuin muutamia grammoja laimennosta läpi. Päätettiin, että muut kokeet suoritetaan 30 min kestoisina, jotta tarkastelu aika säilyisi aina samana. Entsyymiä riitti neljään suodattimen tukkoon ajoon:

Taulukko 15 19.7.2010 Suoritettujen suodatuskokeiden tulokset

| Pvm.      | Kokeen kesto (min) | Laim. Läpi (g) | Ents. Läpi (g) | Tuotannossa (g) | Lämpötila(°C) | Toisto |
|-----------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|--------|
| 19.7.2010 | 30                 | 387,8          | 77,6           | 9397,9          | n.8           |        |
| 19.7.2010 | 30                 | 404,4          | 80,9           | 9797,6          | n.8           | x      |
| 19.7.2010 | 30                 | 410,1          | 80,2           | 9712,8          | n.8           | x      |
| 19.7.2010 | 30                 | 385,0          | 77,0           | 9325,3          | n.8           | x      |

Kokeet toistettiin ja tulosten perusteella voitiin todeta, että jäähdytys piti entsyymilaimennoksen stabiilina. Kirjallisuuden pohjalta oli tiedossa, että joissakin suodatus prosesseissa käytetään suoloja lisäämään proteiinien liukoisuutta veteen. Laimentamattoman entsyymien mineraalikoostumus määritettiin ja tulosten perusteella laimennoksen. Valitut suolat ovat yleisesti proteiinien liukoisuutta parantavia ja niitä esiintyy luonnossa proteiinien kanssa. Tässä kohtaa koe vaikutti toistettavalta ja laimennos vaikutti käyttäytyvät suhteellisen stabiilisti.

Taulukko 16 Valio Oy T&K tekemä ionien pitoisuus analyysi

| Apuaine suodatukseen |               |                 |               |                 |
|----------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
|                      | a. Entsyymi   |                 | b. Entsyymi   |                 |
|                      | Laimentamaton | Laimennettu 20% | Laimentamaton | Laimennettu 20% |
| Suola 1. mg/kg       | 830           | 180             | 46            | 23              |
| Suola 2. mg/kg       | 11000         | 2100            | 11000         | 3400            |

Taulukko 17 Analyysien perusteella laskettu suolojen lisäys



| Entsyymi laimennos 20 % + apuaineet |                           |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Sisältö                             | a. Entsyymi               |
| Vettä g                             | 1600                      |
| Entsyymiä g                         | 400                       |
| Ioni 1. suola g                     | 3,304567203 $\approx$ 3,3 |
| Ioni 2. suola g                     | 33,93836317 $\approx$ 34  |

Entsyymeistä määritetyt mineraalipitoisuudet erosivat toisistaan. Laimennoksissa käytettiin entsyymien a. pitoisuuksia, koska sillä tukkeutumista havaittiin useammin. Lisäksi a. entsyymissä oli suuremmat ionien pitoisuudet.

Seuraavissa suodatuskokeissa laimennokseen lisättiin suolat. Saatiin seuraavanlaiset tulokset (Taulukko 16).

Taulukko 18 20.7.2010 Suoritetujen suodatuskokeiden tulokset

| Pvm.      | Kokeen kesto (min) | Laim. Läpi (g) | Ents. Läpi (g) | Tuotannossa (g) | Lämpötila(°C) | Toisto |
|-----------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|--------|
| 20.7.2010 | 30                 | 366,4          | 73,3           | 8877,2          | n.7           |        |
| 20.7.2010 | 30                 | 310,6          | 62,1           | 7520,8          | n.7           | x      |
| 20.7.2010 | 30                 | 346,2          | 69,2           | 8380,6          | n.7           | x      |
| 20.7.2010 | 30                 | 354,7          | 70,9           | 8586,5          | n.7           | x      |

Työ suoritettiin samalla tavalla kuin edellinen, ainoa ero oli apuaine. Entsyymi laimennos oli kylmää, kun suola lisättiin siihen, mikä todennäköisesti aiheutti suodattimien nopeamman tukkeutumisen. Tuloksista nähdään, että suodatin tukkeutui nopeammin kuin ilman apuainetta. Seuraavaan kokeeseen päätettiin liuottaa suolat huoneenlämpöiseen veteen, jonka jälkeen lisättiin entsyymi ja jäähdytettiin n.7 °C asteeseen ja annettiin lämmitä vapaasti huoneen lämmössä suodatuskokeen aikana. Tämän korjauksen jälkeiset tulokset nähtävissä Taulukossa 19.

Taulukko 19 28.7.2010 Suoritetujen suodatuskokeiden tulokset

| Pvm.      | Kokeen kesto (min) | Laim. Läpi (g) | Ents. Läpi (g) | Tuotannossa (g) | Lämpötila(°C) | Toisto |
|-----------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|--------|
| 28.7.2010 | 30                 | 334,9          | 67,0           | 8114,1869       | 7,0- 7,9      |        |
| 28.7.2010 | 30                 | 426,4          | 85,3           | 10330,45        | 8,2- 9,5      | x      |
| 28.7.2010 | 30                 | 432,4          | 86,5           | 10475,779       | 9,7- 11       | x      |

Koe toistettiin 3 kertaa. Tulokset ovat huomattavasti paremmat kuin edellisellä kerralla. Ensimmäinen suodatin tukkeutui nopeammin. Laimennos ei ollut samea, mutta suolan liukeneminen ei välttämättä ollut täydellistä. Se olisi voinut aiheuttaa ensimmäisen kokeen eron verrattuna muihin. Kaksi toistoa oli hyvin samanlaisia, eroa kokeiden välillä ei jäänyt kuin 6g laimennosta. Toisaalta jos katsoo lämpötiloja, havaitaan että 28.7. laimennos sai vapaasti lämmitä 7,0 asteesta eteenpäin. 20.7. laimennosta jäähdytettiin jatkuvasti. Lämpenemisellä haluttiin tutkia, mikä lämpötila soveltui

parhaiten suodatukselle ja apuaineelle. Tuloksista voidaan tulkita, että optimaalilämpötila olisi n. 10 °C, joka on käytössä prosessissa.

Kokeita jatkettiin siten, että laskettiin suodatuslämpötilaa 10 °C:sta muutamalla asteella. Tällä pyrittiin tutkimaan paras mahdollinen suodatuslämpötila.

Suodatuskoe suoritettiin kuten aiemmin ja laimennokseen lisättiin apuaine. Laimennos jäähdytettiin 7,0 °C ja täytettiin laitteisto entsyymillä. Entsyymilaimennoksen annettiin vapaasti lämmetä kokeensuorituksen aikana, ja lämpötilaa seurattiin jatkuvasti. Suoritettiin kaksi ajoa.

Taulukko 20 2.8.2010 Suoritettujen kokeiden tulokset

| Pvm.     | Kokeen kesto (min) | Laim. Läpi (g) | Ents. Läpi (g) | Tuotannossa (g) | Lämpötila °C | Toisto |
|----------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|--------------|--------|
| 2.8.2010 | 30                 | 396,0          | 79,2           | 9591,7          | 7,0- 8,6     |        |
| 2.8.2010 | 30                 | 405,2          | 81,0           | 9809,69         | 8,6- 9,9     | x      |

Tuloksista nähdään, että ne ovat hyvin vertailukelpoisia edellisten kokeiden kanssa. Apuaineella ei näytä olevan merkittävää vaikutusta suodattavuuden kannalta. Sen sijaan lämpötila vaikuttaa vähän suodattavuuteen. 10 °C entsyymilaimennos vaikuttaa suodattuvan parhaiten. Lämpötilan noustessa huoneenlämmön lukemiin tukkeutuminen on nopeampaa.

Näiden tulosten perusteella haluttiin ottaa uudelleen kokeisiin b. entsyymi, koska lämpötilan muutos näkyi hieman kokeissa. Syöttösuppilokokeissa sitä ei käytetty vielä, koska alussa suoritettujen kokeiden perusteella, se ei tukkinut kalvoa 30 minuutissa, jolloin entsyymilaimennos kului loppuun. Työ suoritettiin edellisten kokeiden tavoin, mutta apuainetta ei lisätty.

Taulukko 21 4.8.2010 Suoritettujen kokeiden tulokset

| Pvm.     | Kokeen kesto (min) | Laim. Läpi (g) | Ents. Läpi (g) | Tuotannossa (g) | Lämpötila °C | Toisto |
|----------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|--------------|--------|
| 4.8.2010 | 5                  | 470            | 94             | 11384,1         | 7,7- 8,0     |        |
| 4.8.2010 | 7                  | 523,9          | 104,8          | 12692           | 8,3- 8,8     | x      |

Tulokset ovat samansuuntaisia kuin alussa todettiin. Entsyymilaimennos on laadultaan niin hyvää, että tässä kokeessa havaitaan vai pientä tukkeutumista. Näiden tulosten perusteella päätettiin keskittyä tutkimaan vain a. entsyymiä.

Apuaineen vaikutus tulosten perusteella oli hyvin pieni tai se ei vaikuttanut ollenkaan. Lämpötilan vaikutus näytti olevan suurempi, lämpötila alue prosessissa oli oikea, eikä sitä tarvitse korjata.

Opinnäytetyölle asetettujen kysymysten perusteella selvittämättä niistä oli pH:n vaikutus suodatettavaan laimennokseen. pH on merkittävä tekijä proteiinien liukenemisessa ja pH määrää niiden rakenteen varauksen sekä

koon. Kyseiset entsyymit ovat hiivaperäisiä ja niiden optimi pH on 6-7. Hiivaperäisten entsyymien isoelektrinen piste on n. pH 5,5. Kun pH alueella liikutaan isoelektrisen pisteen yläpuolisella alueella, proteiinien varaus on positiivinen, kun alapuolella niin negatiivinen. Varauksen muuttamisella on tarkoitus entsyymien saostuminen, koska samanmerkkiset varaukset hylkivät toisiaan.

Valmistettiin entsyymilaimennokset ja mitattiin niiden pH:t, jotta voitaisiin miettiä miten pH:ta voitaisiin muuttaa.

Taulukko 22 a.- ja b.entsyymien kahden eri erän pH arvot

| Entsyymi          | pH   |
|-------------------|------|
| a. entsyymi erä 1 | 7,21 |
| a. entsyymi erä 2 | 7,06 |
| b. entsyymi erä 1 | 7,53 |
| b. entsyymi erä 2 | 7,48 |

Tutkitut entsyymit ovat erilaisia, koska ne valmistetaan erinä. Edellisissä kokeissa käytettiin eri eriä. Hyvin suodattuvan entsyymierän b. entsyymi erä 1 pH on 7,53. Seuraavan kokeen tarkoitus oli muuttaa a. entsyymien erä 1 pH samaa. Tämän lisäksi haluttiin kokeilla, miten entsyymilaimennos käyttäytyy, kun pH lasketaan 7:ään.

Valmistettiin entsyymilaimennos a. entsyymistä erä 1, laimennoksen pitoisuus oli 20 %. Laimennoksen pH tässä vaiheessa oli 7,4. Tehtaan veden pH oli 7,85, mikä nostaa laimennoksen pH:ta. Ensin kokeiltiin pH:n laskua, säätö tapahtui 0,1 M suolahapolla. Säädettiin pH 7:ään, lisätty suolahapon määrä oli vain n. 20 ml, joten se ei vaikuta merkittävästi laimennoksen muutokseen. Suolahapon pH oli 1. Tämän jälkeen koe suoritettiin samalla tavalla kuin aikaisemmin. Kun aloitettiin suodatuskoe, ei kalvosta tullut mitään läpi. pH säädön aikana laimennokseen ilmestyi saostumia, jotka tukkivat kalvon välittömästi. Kokeiltiin vaihtaa kalvo ja ajettiin entsyymi uudelleen laitteistoon sekä ilmattiin laitteisto. Sama lopputulos, mitään ei tullut läpi.

Kokeiltiin nostaa pH:ta. Valmistettiin uusi laimennos samasta entsyymistä. pH:ta nostettiin 0,1 M natriumhydroksidilla 7,79. Tämän jälkeen toimitettiin samalla tavalla kuin ennen. Suoritettiin 30 min kestävä suodatuskoe.

Taulukko 23 5.8.2010 a. entsyymi erä 1 pH säädetty 7.79 kokeen tulokset

| Pvm.     | Kokeen kesto (min) | Laim. Läpi (g) | Ents. Läpi (g) | Tuotannossa (g) | Lämpötila °C |
|----------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|--------------|
| 5.8.2010 | 30 min             | 324,0 g        | 64,8 g         | 7847,75 g       | 8,8- 10,1    |

Tuloksista voidaan havaita, että edellisissä kokeissa ilman pH:n säätöä päästiin parempiin tuloksiin. pH:n säädöllä ei saavutettu parempaa suodattavuutta.

Ongelmana pH:n säädössä on säätöliuosten liian suuri pitoisuus. Proteiinit ovat herkkiä pH:n muutoksille ja liian suuri paikallinen muutos voi aiheuttaa pysyviä muutoksia niiden rakenteeseen, josta seuraa sakkautuminen. Parempi keino olisi käyttää puskuriliuosta puhtaanveden sijasta.

Laadittuihin kysymyksiin oli etsitty vastauksia käytännöntöistä, pääpaino oli lämpötilan vaikutuksen etsimisellä sekä apuaineen valmistamisella. pH:n vaikutuksen etsimiseen ei aikaa jäänyt paljoa ja siten erilaisia menetelmiä ei ehditty kokeilla.

## 8 TULOSTENTARKASTELU

Työn tarkoitus oli vastata kysymyksiin; Miten lämpötila, aika ja laimennos vaikuttavat suodatettavuuteen? Miten entsyymilaimennoksen pH vaikuttaa suodatuksessa? Miten suodatin vaikuttaa suodatukseen? Kysymyksiin lähdettiin etsimään vastauksia kokeiden ja kirjallisuuden kautta. Kirjallisuudesta saatujen tietojen perusteella lähdettiin luomaan omaa koetta suodatettavuuden testaamiseksi. Aikaisemmin suodattimien toimittaja oli suorittanut kokeita, joissa tukkeutumista pyrittiin havaitsemaan. He eivät kuitenkaan havainneet tukkeutumista. Testin ideana oli ajaa pieni aika suodattimella, toistaa testi ja laskea näiden välille indeksi, joka kuvaa suodattimen tukkeutumista.

Alussa koesuodatuksissa pyrittiin tuotantoa vastaaviin olosuhteisiin ja tukkeutumiskäyttäytymiseen. Koejärjestelyä jouduttiin hiomaan paljon, koska tämänkaltaisesta kokeesta ei ollut aiempaa kokemusta. Tarkoitus oli kehittää menetelmä, jolla entsyymien suodattavuutta voitaisiin mitata. Kokeessa tutkittaisiin, miten virtaus muuttuu ajan ja suodatetun entsyymimäärän myötä. Kun havaittaisiin tukkeutuminen, voitaisiin vertailla eri tekijöitten vaikutusta tukkeutumiseen.

Tukkeutumisen havaitsemisen jälkeen haluttiin tutkia miten tukkeutuminen tapahtuu. Tehtiin toistokokeita ja tuloksia analysoitiin. Kokeita toistettaessa paine ei noussut yli 2 bar muutaman kokeen jälkeen, vaan paine jäi hieman alle 2 bar. Kokeesta tuli siis vakiopaineinen. Vakiopaineisuus osoitti sen, että virtaus väheni lopussa huomattavasti. Tämä oli yksi syistä, miksi paine haluttiin vakioksi. Letkupumppua käytettäessä huomattiin, että tulokset erosivat paljon toisistaan, mutta entsyymien välinen ero ei ollut suuri. Letkupumpulla suoritettujen kokeiden määrä jäi vähäiseksi. Tämän vuoksi ei ole järkevää tutkia tilastollisia riippuvuuksia kokeissa, joissa käytettiin letkupumppua.

Kokeet aloitettiin letkupumpulla, jossa pumppaus perustuu letkun tilavuuden muuttamiseen. Pumppu on ns. peristalttinen, eli se aiheuttaa sykäyksiä. Kirjallisuus lähteiden perusteella tämä voi aiheuttaa proteiinien denaturoitumista, joten haluttiin muuttaa syöttö erityyppiseksi. Suodatin tukkeutui myös syöttösuppilolla. Huomattavaa oli, että nyt kahden erilaisen entsyymien laadullisen eron havaitsi välittömästi suodatuskokeen alussa. Kun koejärjestely oli hiottu, kehitettiin apuainetta huonolaatuisen entsyymien suodattamiseen. Apuaine muodostui kahdesta suoloista, joilla pyrittiin lisäämään proteiinin liukoisuutta veteen. Tulosten perusteella apuaineella

ei kuitenkaan saavutettu parannusta. Tämän lisäksi selvitettiin suodatuslämpötilan vaikutusta. Kokeet antoivat viitteitä, että optimilämpötila-alue sijaitsee n. 10 °C:ssa, mutta selvää vaikutusta lämpötilan muuttamisella ei todettu. Lisäksi selvitettiin vielä lyhyesti pH:n vaikutus suodatettavuuteen. Kokeiden perusteella pH:n säätö ei ole hyödyllistä. Ongelmana saattoi olla pH säätöaineiden liian suuri pitoisuus, joka aiheutti proteiinien denaturoitumisen ja sitä kautta suodattimen tukkeutumisen.

Tutkittiin apuaineen vaikutusta tilastollisesti suodatuskokeessa. Otettiin syöttösuppilon tulokset ilman apuainetta ja apuaineen kanssa. Vertailtiin 4 erisuodatus kertaa toisiinsa suodatetun entsyymimäärän perusteella.

Suoritettiin X2 riippumattomuustesti. Muodostettiin havaituista frekvensseistä kontingenssitaulukko taulukko (Taulukko 24). Asetettiin hypoteesit,  $H_0$  = Suodatettavuus ei ole riippuvainen apuaineesta,  $H_1$  = Apuaineella on saavutettu parempi suodatettavuus

Taulukko 24 Havaittujen frekvenssien kontingenssitaulukko

|                         | koe 1        | koe 2      | koe 3        | koe 4        | yht.         |
|-------------------------|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>apuaine</b>          | 77,6         | 80,9       | 80,2         | 77           | <b>315,7</b> |
| <b>ilman apuainetta</b> | 73,3         | 62,1       | 69,2         | 70,9         | <b>275,5</b> |
|                         | <b>150,9</b> | <b>143</b> | <b>149,4</b> | <b>147,9</b> | <b>591,2</b> |

Muodostettiin teoreettiset frekvenssit kertomalla kutakin solua vastaavat rivi- ja sarakesummat keskenään ja jaetaan tulo kokonaisfrekvenssillä 591,2. Saatiin teoreettiset frekvenssit, joista X2 -testimuuttujan arvo voidaan laskea.

Taulukko 25 Muodostetut teoreettiset frekvenssit

|                         | koe 1 | koe 2 | koe 3 | koe 4 |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <b>apuaine</b>          | 80,58 | 76,36 | 79,78 | 78,98 |
| <b>ilman apuainetta</b> | 70,32 | 66,64 | 69,62 | 68,92 |

Testimuuttujan arvoksi saatiin  $X^2 = 9,68$ . Johtopäätös: 5 %:n merkitsevyystasolla vapausastein  $f = (2-1) \cdot (4-1) = 3$ , kriittinen arvo  $X^2$ - jakaumassa on 7,81. Koska  $9,68 > 7,81$ ,  $H_0$  hylätään.

Tulkinta: Tämä tutkimus osoittaa, että apuaine on parantanut suodatettavuutta. Vertailemalla frekvenssejä voidaan kuitenkin todeta, että parannus on pientä.

## 9 PARANNUSEHDOTUKSET PROSESSIIN

Prosessiin ei ole tehtävissä suuria parannuksia. Suodatuskokeilla ei saavutettu toivottuja tuloksia. Suodatuskapasiteettia ja suodattimen kestoikää voidaan lisätä kasvattamalla suodatinpatruunan pinta-alaa. Suodatin val-

---

mistajalla on tarjolla suurempi suodatinpatruuna, mutta tämä muutos vaatii suodatinpesän uusimista aldose- annostelijalle.

Prosessissa tuoteajon aikana lämpötila syöttösäiliössä on n. 10 °C, mutta vesikierrolla lämpötila nousee 12,6 °C:een. Tämä lämpötilan nousu kannattaisi välttää, jolloin lämpötilan vaihtelusta mahdollisesti aiheutuva proteiinien sakkautuminen voitaisiin minimoida. Lisäksi suodattimien väliset putket ovat avoimia eikä niissä ole jäähdytystä. Tähän olisi hyvä lisätä jäähdytys sekä suojaus. Suojaamattomuus ja jäähdytyksen puuttuminen saattavat aiheuttaa sen, että entsyymi lämpenee suodatinpesässä vesikierrolla prosessisalin lämpöön, joka voi olla pahimmillaan yli 30 °C sterili-saattorin vieressä. Tämä saattaa aiheuttaa mikrobienkasvua kalvonpinnalle ja entsyymien saostumista.

Toisentyypisten suodattimien kokeilemista olisi hyvä harkita, koska dead-end suodatuksella tukkeutuneita suodattimia ei voida käyttää uudelleen. Käytettävät suodattimet ovat tyypiltään syväsuodattimia, joissa erotus tapahtuu kalvorakenteen sisässä. Tästä syystä takaisin huuhtonta ei tule kysymykseen käytössä olevalle kalvolle.

---

## LÄHTEET

Biochemistry, third edition, Lubert Stryer, W. H. Freeman and company, 1988, New York

Protein purification process engineering, Roger G. Harrison, 1994, New York

Ultrafiltration and Microfiltration handbook, Munir Cheryan, 1998, Technomic publishing company, Urbana, Illinois, USA

Advanced dairy chemistry volume 3: Lactose, water, salts and vitamins, P.F.Fox, 1997, St Edmundsbury, Iso Britannia

Söderström, S. 2007. Laktaasi- entsyymien puhdistaminen jäännössivuaktiivisuuksista, Valio Oy T&K, Diplomityö

Tossavainen, O. 2008. Heat-induced changes in lactose hydrolysed milks, yliopistopaino, Helsinki Doctoral dissertation, Helsinki University of Technology

Membrane filtration and related molecular separation technologies, APV Systems, International Dairy books, Werner Kofod Nielsen, 2000, Denmark

Pall Corporation 2003, esitysmateriaali, An Introduction to Sterilizing Grade Filters

Steriloinnin yleiset periaatteet. 15.7.2010.  
<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:FL5Ez4EVqb8J:www.pharmtech.helsinki.fi/kurssit/590016/2004/sterilointi.ppt+steriilisuo+data&cd=1&hl=fi&ct=clnk&gl=fi>

Tetra Aldose. Tetra Pak 2008. Viitattu 13.7.2010.  
[http://www.tetrapak.com/fr/SiteCollectionDocuments/Processing/PDF\\_Equipements/Tetra\\_Aldose.pdf](http://www.tetrapak.com/fr/SiteCollectionDocuments/Processing/PDF_Equipements/Tetra_Aldose.pdf)

Hämeenlinnan ammattikorkeakoulu. Oppimateriaali. Viitattu 13.7.2010.  
[http://portal.hamk.fi/portal/page/portal/HAMI/Milkworks/Oppimateriaali/mita\\_maito\\_on/maidon\\_muut\\_ominaisuudet/happamuus](http://portal.hamk.fi/portal/page/portal/HAMI/Milkworks/Oppimateriaali/mita_maito_on/maidon_muut_ominaisuudet/happamuus)

Hiltunen, S. 2007. Proteiinien erotus ultrasuodatuksella. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Viitattu 3.8.2010.  
<https://oa.doria.fi/bitstream/handle/10024/30902/TMP.objres.634.pdf?sequence=1>